

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ERIK NUNES GOMES

ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E NUTRIÇÃO MINERAL NO  
ACÚMULO DE BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM  
*Stevia rebaudiana* Bertoni

CURITIBA  
2017

ERIK NUNES GOMES

ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E NUTRIÇÃO MINERAL NO  
ACÚMULO DE BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM  
*Stevia rebaudiana* Bertoni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Deschamps

Co-orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Erika Amano  
Prof. Dr. Volnei Pauletti

CURITIBA  
2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)

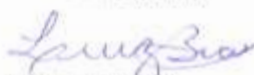
## TERMO DE APROVAÇÃO

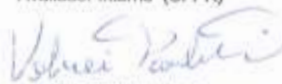
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ERIK NUNES GOMES** intitulada: **ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E NUTRIÇÃO MINERAL NO ACÚMULO DE BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM *Stevia rebaudiana* Bertoni**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO**.

Curitiba, 21 de Fevereiro de 2017.

  
CICERO DESCHAMPS  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
ERIKA AMANO  
Avaliador Externo (UFPR)

  
LUIZ ANTONIO BIASI  
Avaliador Interno (UFPR)

  
VOLNEI PAULETTI  
Avaliador Externo (UFPR)

Aos trabalhadores do campo e suas famílias, por darem seu suor para alimentar o mundo e contribuir para o progresso da nação.

Ao povo trabalhador brasileiro, que, por meio de impostos, torna possível o financiamento da pesquisa nacional, mesmo que frequentemente não tenha acesso aos seus resultados e eventuais benefícios dela advindos.

À minha família, que inclui-se nos dois grupos supracitados, por ter tornado este estudo possível.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À UFPR, pelo apoio institucional e Financeiro para a realização deste estudo.

Ao professor Fernando Prates Bisso, pela orientação durante o curso de graduação e inspiração para a vida acadêmica.

Ao professor Überson Boaretto Rossa, pelo incentivo à pesquisa como forma de ensino e aprendizagem e parcerias acadêmicas.

Ao professor Luciano Alves, pela orientação durante o período de graduação e apoio no início e no decorrer deste mestrado.

À professora Gislene Miotto C. Raymundo, pela valiosa orientação no estágio do curso de Licenciatura em Ciências Agrícolas que muito agregaram na estruturação desta dissertação e de qualquer forma de expressão escrita que tenha tido a partir de 2013.

Aos professores do Instituto Federal Catarinense Teomar, Monzani, Casemiro, Juliano (jiboião), Noel, Josefa, Cléder, Nelson, André Fachini, Daniel Limeira, Daniel Perozzo, pelos ensinamentos que serviram como base para a conclusão deste mestrado.

Aos demais professores e colegas dos cursos de Licenciatura em Ciências Agrícolas, Medicina Veterinária e Técnico em Agrimensura do Instituto Federal Catarinense – *Campus Araquari*, pelo auxílio no início desta jornada.

Ao amigo Leandro Zanettinho, pelas parcerias acadêmicas, gastronômicas e futebolísticas.

Aos amigos Felipe Francisco e Gaby, pelas parcerias acadêmicas e conversas produtivas, bem humoradas e inconclusas.

Ao amigo Prof. Dr. Diones Krinski pela produtiva parceria acadêmica e inspiração.

Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da UFPR, Rafa, Maíra, Jéssica, Aurea, Renata, pela solidariedade acadêmica e amizade.

Ao Técnico do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e amigo Roger Raupp Cipriano, pelo auxílio acadêmico e exemplo.

Aos Técnicos Carlos Maduro e Maria Emília, pelo apoio na condução dos experimentos.

À Secretária Lucimara Antunes, pelo profissionalismo e desburocratização dos assuntos acadêmicos no programa de pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal.

Aos Funcionários do Setor de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas do Centro de Estações Experimentais do Canguiri (UFPR), Sr. Altair e Lourival, pelo imenso apoio na condução dos trabalhos no campo e pelas risadas, que não foram poucas.

Aos amigos Juliana, Cíntia, Ângelo, Micheli e Mirelli, pelas produtivas conversas e parcerias acadêmicas.

Ao professor Dr. Luiz A. Kaniz e Diego Moterlle do Laboratório Tecfarma da Unisul de Tubarão-SC, pelo auxílio com as análises bioquímicas.

Ao professor Dr. Ricardo Augusto de Oliveira, pelo bom senso e serenidade na condução na condução das disciplinas de seminários.

À professora Dr.<sup>a</sup> Kátia C. Zuffellato-Ribas, pelo intenso mergulho na Fisiologia Vegetal, pela imensa inspiração aos estudos nesta área e pelo fantástico modelo de didática e avaliação.

Ao prof. Dr. Luiz Antonio Biasi, pelo exemplo profissional e atenção nas correções realizadas na defesa e pré-defesa desta dissertação.

Ao prof. Dr. Volnei Pauletti, pelo auxílio na realização das análises nutricionais, coorientação e pertinentes considerações realizadas nas bancas de pré-defesa e defesa.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Erika Amano, pela coorientação, pelas considerações valiosas nas bancas de defesa e pré-defesa, pela introdução no fascinante mundo da morfologia e anatomia vegetal e pela imensa atenção despendida durante todo o processo de condução dos experimentos no laboratório de Botânica Estrutural da UFPR.

Ao prof. Dr. Cícero Deschamps, pela brilhante orientação deste mestrado, pelo incentivo à produtividade acadêmica, exemplos de profissionalismo, polidez e temperança e por me apresentar o cativante e dinâmico universo do metabolismo secundário vegetal.

À Minha família, especialmente meus pais, João Pedro e Soeli, pelo amor e irrestrito apoio em todas as atividades acadêmicas, profissionais e pessoais.

*“E se o mundo não corresponde em todos os aspectos a nossos desejos, é culpa da ciência ou dos que querem impor seus desejos ao mundo?”*

Carl Sagan

ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E NUTRIÇÃO MINERAL NO  
ACÚMULO DE BIOMASSA E DE GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM  
*Stevia rebaudiana* Bertoni

**RESUMO GERAL**

*Stevia rebaudiana* Bertoni é uma espécie vegetal cuja importância comercial está ligada à produção de metabólitos secundários denominados glicosídeos diterpênicos, moléculas sem valor calórico e com alto potencial adoçante. Dentre os glicosídeos diterpênicos os que ocorrem em maior quantidade e possuem valor comercial mais elevado são o esteviosídeo e rebaudiosídeo A. O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a influência de épocas de colheita, espaçamentos e aplicação de doses de fertilizante de liberação controlada nos aspectos fisiológicos e produtivos de um acesso de estêvia. Para tal foram realizados dois experimentos, organizados em quatro capítulos. O primeiro capítulo descreve o efeito de diferentes densidades de plantio e épocas de colheita nas características produtivas, fisiológicas e bioquímicas da espécie em condições de campo. Foram testadas três densidades de plantio (166.667; 83.333; e 33.333 plantas ha<sup>-1</sup>) e três épocas de colheita (antes, no início e a pleno florescimento). A interação entre a densidade de 166.667 plantas ha<sup>-1</sup> e a colheita no início do florescimento promoveu maiores produtividades de rebaudiosídeo A (43,22 kg ha<sup>-1</sup>) e esteviosídeo (73,21 kg ha<sup>-1</sup>), bem como maior relação rebaudiosídeo A/ esteviosídeo (0,60). O segundo capítulo teve por objetivo avaliar adaptações anatômicas e produção de glicosídeos diterpênicos em segmentos apicais, medianos e basais de plantas cultivadas nas densidades de plantio descritas para o capítulo anterior. A competição entre plantas nas diferentes densidades promoveu alterações estruturais na espessura do limbo foliar e densidade de tricomas tectores e glandulares. Os teores de rebaudiosídeo A e esteviosídeo não demonstraram relação com os caracteres anatômicos avaliados, apresentando tendência de maior acúmulo em folhas da região mediana. A maior disponibilidade de luz no espaçamento menos adensado em interação com a região apical promoveu maiores teores de rebaudiosídeo A (35,59 mg g<sup>-1</sup>), enquanto que o esteviosídeo mostrou tendência de maior acúmulo na região mediana da planta. No terceiro capítulo, relata-se a resposta nutricional da espécie quando submetida a doses de 0; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 mg dm<sup>-3</sup> de do fertilizante de liberação controlada (Basacote<sup>®</sup> Mini 6M), incorporado ao solo em condições de casa de vegetação. O teor médio de nitrogênio nas folhas foi de 23,68 g kg<sup>-1</sup>. A similaridade nas respostas, especialmente entre magnésio e fósforo, evidenciam um efeito de sinergismo. A diminuição na eficiência de utilização de cálcio e potássio em doses mais elevadas está relacionada ao aumento em seus conteúdos foliares e leve decréscimo no acúmulo de biomassa nessas condições. O quarto capítulo versa sobre o efeito das mesmas doses do fertilizante nos aspectos produtivos de *Stevia rebaudiana*. As doses de máxima eficiência técnica para produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram de 625,04 e 640,17 mg dm<sup>-3</sup> do Basacote<sup>®</sup> Mini 6M, respectivamente. O alto custo dos fertilizantes de liberação controlada faz necessário o estudo da viabilidade econômica para utilização desta tecnologia no cultivo de estêvia.

**Palavras-chave:** Basacote<sup>®</sup>, estêvia, esteviosídeo, rebaudiosídeo A, tricomas.



PHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL ASPECTS AND MINERAL NUTRITION  
ON BIOMASS AND DITERPENE GLYCOSIDES YIELD IN  
*Stevia rebaudiana* Bertoni

**ABSTRACT**

*Stevia rebaudiana* Bertoni is a plant species whose commercial importance is linked to the production of secondary metabolites called diterpene glycosides, molecules with no calorific value and high sweetening potential. Among the diterpene glycosides, stevioside and rebaudioside A occur in greater quantity and have a higher commercial value. The general objective of the present study was to evaluate the influence of harvesting times, spacing and application of controlled release fertilizer doses on the physiological and productive aspects of a stevia accession. Two experiments were carried out and organized in four chapters. The first chapter aimed to evaluate the effect of different planting densities and harvesting times on the productive, physiological and biochemical characteristics of the species under field conditions. Three planting densities (166667, 83333 and 33333 plants ha<sup>-1</sup>) and three harvesting times (before, at the onset and at full flowering) were tested. The interaction between the density of 166667 plants ha<sup>-1</sup> and harvesting at the onset of flowering promoted higher yields of rebaudioside A (43.22 kg ha<sup>-1</sup>) and stevioside (73.21 kg ha<sup>-1</sup>), as well as higher rebaudioside A / stevioside ratio (0.60). The second chapter aimed to evaluate anatomical adaptations and production of diterpene glycosides in apical, median and basal segments of plants grown at the planting densities described for the previous chapter. The competition between plants at different spacings promoted structural changes in leaf limb thickness and density of glandular and non-glandular trichomes. The levels of rebaudioside A and stevioside did not show any relation with the adaptations and anatomical characters evaluated, showing tendency of greater accumulation in leaves of the median region. The greater availability of light in the less densely spaced planting associated with the apical region, promoted higher levels of rebaudioside A (35.59 mg g<sup>-1</sup>), whereas stevioside showed a tendency of greater accumulation in the median region of the plant. In the third chapter, we report the nutritional response of the species when submitted to doses of 0; 62.5; 125; 250; 500 and 1000 mg dm<sup>-3</sup> of the controlled release fertilizer (Basacote<sup>®</sup> Mini 6M), incorporated into the soil under greenhouse conditions. The average nitrogen content in leaves was 23.68 g kg<sup>-1</sup>. The similarity in the responses, especially between magnesium and phosphorus, evidences an effect of synergism. The decrease in the calcium and potassium efficiency of utilization in higher doses is related to the increase on its leaf contents and slight decrease of biomass accumulation under these conditions. The fourth chapter describes the effect of the same doses of fertilizer on the productive aspects of *Stevia rebaudiana*. The maximum technical efficiency doses for stevioside and rebaudioside A were 625.04 and 640.17 mg dm<sup>-3</sup> of Basacote<sup>®</sup> Mini 6M, respectively. The high cost of controlled release fertilizers makes it necessary to study the economic feasibility of using this technology in stevia cultivation.

**Key words:** Basacote<sup>®</sup>, rebaudioside A, stevia, stevioside, trichomes.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1.</b> Fenologia da floração de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	31
<b>Figura 2.</b> Biossíntese de glicosídeos de esteviol em estévia.....	35
<b>Figura 3.</b> Estrutura dos principais glicosídeos diterpênicos de <i>Stevia rebaudiana</i> ...	36
<b>Figura 4.</b> Distribuição espacial do acúmulo de glicosídeos de esteviol em estévia sob dias curtos e dias longos .....	39

### CAPÍTULO 4 – ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CULTIVADAS EM DIFERENTES ESPAÇAMENTOS

<b>Figura 1.</b> Microscopia eletrônica de varredura da epiderme de folhas de segmentos de plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> cultivada em diferentes espaçamentos .....	91
<b>Figura 2.</b> Densidade de tricomas tectores grandes, tricomas tectores pequenos e tricomas glandulares em segmentos apical, mediano e basal de plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> cultivadas em diferentes espaçamentos.....	92

### CAPÍTULO 5 – ASPECTOS NUTRICIONAIS EM FOLHAS E RAMOS DE *Stevia rebaudiana* EM FUNÇÃO DE DOSES DE FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

<b>Figura 1.</b> Teores de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em folhas e ramos de <i>Stevia rebaudiana</i> em função de doses de fertilizante de liberação controlada.....	112
<b>Figura 2.</b> Conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em folhas e ramos de <i>Stevia rebaudiana</i> em função de doses de fertilizante de liberação controlada.....	114
<b>Figura 3.</b> Índices de eficiência de utilização de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em folhas e ramos de <i>Stevia rebaudiana</i> em função de doses de fertilizante de liberação controlada.....	119

### CAPÍTULO 6 – EFEITO DE DOSES DE FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA NO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE GLICOSÍDEOS DE ESTEVIOL EM *Stevia rebaudiana* Bertoni

<b>Figura 1.</b> Efeito de doses de fertilizante de liberação controlada na altura, número de ramificações, área foliar, massa seca de folhas e massa seca de parte aérea em <i>S. rebaudiana</i> . .....	134
---	-----

**Figura 2.** Efeito de doses de fertilizante de liberação controlada nos teores de clorofilas, relação clorofila *a/b*, teores de proteínas e teores de açúcares totais em *S. rebaudiana*. ..... 139

**Figura 3.** Efeito de doses de fertilizante de liberação controlada nos teores de esteviosídeo, rebaudisídeo A, Relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo, produtividade de esteviosídeo e produtividade de rebaudiosídeo A em *S. rebaudiana*..... 142

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 3 – EFEITO DE DENSIDADES DE PLANTIO E ÉPOCAS DE COLHEITA EM ASPECTOS FISIOLÓGICOS E PRODUTIVOS DE *Stevia rebaudiana* BERTONI**

**TABELA 1.** Condições climáticas durante o experimento com densidades de plantio. Pinhais/PR, 2015/2016.....49

**TABELA 2.** Características químicas e granulométricas do solo utilizado no experimento com densidades de plantio. Pinhais, 2015/2016. ....50

**TABELA 3.** Médias de altura, número de ramificações , índice de área foliar , área foliar específica razão de peso foliar e razão de área foliar em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita .....56

**TABELA 4.** Médias de massa seca de folhas e massa seca de parte aérea por planta e produtividade de massa seca de folhas em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita.....59

**TABELA 5.** Médias de produtividade de massa seca de parte aérea em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita.....60

**TABELA 6.** Médias de teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, relação clorofila *a/b*, proteínas, açúcares totais em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita .....62

**TABELA 7.** Médias de teores de esteviosídeo, rebaudiosídeo A, relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita.....66

### **CAPÍTULO 4 – ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CULTIVADAS EM DIFERENTES ESPAÇAMENTOS**

**TABELA 1.** Médias de massa seca de folhas em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos.....82

**TABELA 2.** Médias de massa seca de parte aérea e produtividades de massa seca de folhas e massa seca de parte aérea em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos.....83

**TABELA 3.** Médias de índice de área foliar, área foliar específica, razão de peso foliar e razão de área foliar em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. ....85

**TABELA 4.** Médias de espessura de parênquimas lacunoso e paliçádico, espessura total do limbo foliar e porcentagem relativa de parênquima paliçádico no limbo foliar

em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos.....89

**TABELA 5.** Médias de teores rebaudiosídeo A e relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. s.....94

**TABELA 6.** Médias de teores de esteviosídeo e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. ....95

## **CAPÍTULO 5 – ASPECTOS NUTRICIONAIS EM FOLHAS E RAMOS DE *Stevia rebaudiana* EM FUNÇÃO DE DOSES DE FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA**

**TABELA 1.** Resultados de análise química do solo utilizado no experimento. Curitiba/2016..... 109

**TABELA 2.** Composição química do Fertilizante de liberação controlada Basacote® Mini 6M..... 110

## LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Resumo da análise de variância para altura, ramificações e índices fisiológicos de *S. rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita ..... 164
- ANEXO 2.** Resumo da análise de variância para massa seca de folhas e massa seca de parte aérea por planta (MFP; MAP) e produtividades de massa seca de folhas e massa seca de parte aérea (MFH; MAH) em *S. rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio (D) e épocas de colheita ..... 164
- ANEXO 3.** Resumo da análise de variância para teor de clorofila A, clorofila B, clorofila total, relação de clorofila A e B, proteínas totais e Açúcares totais em *S. rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita .. 164
- ANEXO 4.** Resumo da análise de variância para teores de esteviosídeo, rebaudiosídeo A, relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em *S. rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita..... 165
- ANEXO 5.** Resumo da análise de variância para massa seca de folhas e massa seca de parte aérea por planta e produtividades de massa seca de folhas e massa seca de parte aérea em três segmentos de plantas de *S. rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos ..... 165
- ANEXO 6.** Resumo da análise de variância para altura índice de área foliar, área foliar específica, razão de peso foliar e razão de área foliar em três segmentos de plantas de *S. rebaudiana* cultivada em diferentes espaçamentos..... 165
- ANEXO 7.** Resumo da análise de variância para espessura de parênquimas lacunoso e paliçádico, espessura total do limbo foliar e porcentagem relativa de parênquima paliçádico no limbo em três segmentos de plantas de *S. rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos . ..... 166
- ANEXO 8.** Resumo da análise de variância para teores de esteviosídeo, rebaudiosídeo A, relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em três segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos ..... 166
- ANEXO 9.** Resumo da análise de variância para teores de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em folhas de *Stevia rebaudiana* em função de doses de fertilizante de liberação controlada..... 166
- ANEXO 10.** Resumo da análise de variância para teores de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em ramos de *Stevia rebaudiana* em função de doses de fertilizante de liberação controlada..... 167

<b>ANEXO 11.</b> Resumo da análise de variância para conteúdos de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em folhas de <i>Stevia rebaudiana</i> em função de doses de fertilizante de liberação controlada.....	167
<b>ANEXO 12.</b> Resumo da análise de variância para conteúdos de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em folhas de <i>Stevia rebaudiana</i> em função de doses de fertilizante de liberação controlada.....	167
<b>ANEXO 13.</b> Resumo da análise de variância para índices de eficiência de utilização de de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em folhas de <i>Stevia rebaudiana</i> em função de doses de fertilizante de liberação controlada.....	168
<b>ANEXO 14.</b> Resumo da análise de variância para altura, número de ramificações, área foliar, massa seca de folhas e massa seca total em <i>Stevia rebaudiana</i> sob doses de fertilizante de liberação controlada..	168
<b>ANEXO 15.</b> Resumo da análise de variância para teores de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total, relação clorofila <i>a/b</i> , proteínas e açúcares totais em folhas de <i>Stevia rebaudiana</i> em função de doses de fertilizante de liberação controlada.....	168
<b>ANEXO 16.</b> Resumo da análise de variância para teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo, e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em <i>Stevia rebaudiana</i> sob doses de fertilizante de liberação controlada....	169
<b>ANEXO 17.</b> Fotografias do processo de produção de mudas <i>Stevia rebaudiana</i> por micropropagação.....	170
<b>ANEXO 18.</b> Enraizamento de explantes de <i>Stevia rebaudiana</i> obtidos por micropropagação aos sete dias após o plantio e mudas nos tubetes 45 dias após o plantio .....	171
<b>ANEXO 19.</b> Instalação do experimento com densidades de plantio e épocas de colheita.....	172
<b>ANEXO 20.</b> Colheita do experimento com densidades de plantio e épocas de colheita.....	173
<b>ANEXO 21.</b> Registro fotográfico das análises realizadas em diferentes experimentos. ....	174
<b>ANEXO 22.</b> Registros fotográficos da extração e análise de glicosídeos de esteviol no Laboratório Tecfarma, Unisul. ....	175

## LISTA DE ABREVIATURAS

µm	Micrômetro
°C	Graus Celsius
AFE	Area foliar específica
CENARGEN	Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CMK	4-(cytidine 50 diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase
CPPS	Copalyl diphosphate synthase
DMAPP	Dimethylallyl diphosphate
dm <sup>3</sup>	Decímetro cúbico
DXP	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
DXR	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase
DXS	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FLC	Fertilizante de liberação Controlada
HDS	E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase
HDR	E)-4-hydroxy-3 methylbut-2-enyl diphosphate reductase
GGDP	Geranylgeranyl diphosphate
GGDPS	Geranylgeranyl diphosphate synthase
GL	Graus de liberdade
Ha	Hectare
Glc	Glicose
HPLC	High performance liquid chromatography
IAF	Índice de area foliar
IDI	Isopentenyl diphosphate isomerase
IPP	Isopentenyl diphosphate
KAH	Kaurenoic acid hydroxylase
KO	Kaurene oxidase;
KS	Kaurene synthase
LED	Light Emitting Diode
MCT	4-(cytidine 50 diphospho)-2-C-methyl-D erythritol synthase
MDS	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase
MEP	2-C-methyl-D-erythritol-4 phosphate
PRNT	Poder Relativo de Neutralização Total



RAF	Razão de area foliar
RPF	Razão de peso foliar
SVglys	Glicosídeos de esteviol
Rha	Ramnose
UFPR	Universidade Federal do Paraná
Unisul	Universidade do Sul de Santa Catarina
UGT	Uridine-5'-triphosphate glycosyltransferases
Xyl	Xilose

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
2.1 HISTÓRICO .....	25
2.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA.....	26
2.3 ASPECTOS ECOLÓGICOS.....	28
2.4 ASPECTOS FITOQUÍMICOS.....	32
2.5 ASPECTOS AGRONÔMICOS .....	40
<b>3 EFEITO DE DENSIDADES DE PLANTIO E ÉPOCAS DE COLHEITA EM ASPECTOS FISIOLÓGICOS E PRODUTIVOS DE <i>Stevia rebaudiana</i> BERTONI .</b>	<b>45</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	47
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	48
3.2.1 Implantação, condições edafoclimáticas e condução do experimento .....	48
3.2.2 Material vegetal e produção de mudas.....	49
3.2.3 Delineamento experimental e tratamentos .....	50
3.2.4 Avaliações biométricas e cálculo dos índices fisiológicos .....	51
3.2.5 Determinação dos teores de clorofilas a, b e total.....	51
3.2.6 Determinação dos teores de proteínas totais .....	52
3.2.7 Determinação dos teores de açúcares totais .....	52
3.2.8 Determinação dos teores de rebaudiosídeo A e esteviosídeo .....	52
3.2.9 Análise estatística .....	53
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.3.1 Variáveis biométricas e índices fisiológicos.....	53
3.3.2 Acúmulo e produtividade de biomassa.....	57
3.3.3 Variáveis bioquímicas.....	60

3.3.4 Teor e produtividade de glicosídeos de esteviol.....	64
3.4 CONCLUSÕES .....	68
3.5 REFERÊNCIAS .....	69
<b>4 ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM PLANTAS DE <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni CULTIVADAS EM DIFERENTES ESPAÇAMENTOS .....</b>	<b>76</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	78
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	79
4.2.1 Delineamento experimental e tratamentos .....	79
4.2.2 Análises morfológicas .....	80
4.2.3 Análise estatística .....	81
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.3.1 Acúmulo e produtividade de biomassa.....	81
4.3.2 Índices fisiológicos .....	83
4.3.3 Adaptações morfológicas .....	87
4.3.4 Teor e produtividade de glicosídeos de esteviol.....	92
4.4 CONCLUSÕES .....	97
4.5 REFERÊNCIAS .....	97
<b>5 ASPECTOS NUTRICIONAIS EM FOLHAS E RAMOS DE <i>Stevia rebaudiana</i> EM FUNÇÃO DE DOSES DE FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....</b>	<b>104</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	106
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	107
5.2.1 Localização, instalação e condução do experimento .....	107
5.2.2 Material vegetal e produção de mudas.....	108
5.2.3 Delineamento experimental e tratamentos .....	108

5.2.4 Colheita e determinação de biomassa .....	109
5.2.5 Análises Nutricionais .....	109
5.2.6 Análise estatística .....	110
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
5.3.1 Teor, conteúdo e partição de nutrientes na parte aérea.....	110
5.3.2 Eficiência de utilização de nutrientes .....	117
5.4 CONCLUSÕES .....	122
5.5 REFERÊNCIAS.....	123
<b>6 EFEITO DE DOSES DE FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA NO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE GLICOSÍDEOS DE ESTEVIOL EM <i>Stevia rebaudiana</i>.....</b>	<b>128</b>
6.1 INTRODUÇÃO .....	130
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	131
6.2.1 Colheita e avaliações biométricas .....	132
6.2.2 Análise estatística .....	132
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	132
6.3.1 Variáveis biométricas .....	132
6.3.2 Variáveis bioquímicas.....	137
6.3.3 Glicosídeos de esteviol.....	140
6.4 CONCLUSÕES .....	143
6.5 REFERÊNCIAS.....	143
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>150</b>
<b>REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>153</b>
ANEXOS .....	163

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

*Stevia rebaudiana* Bertoni, popularmente conhecida como estévia, capim doce ou honeyleaf, é um arbusto herbáceo pertencente à família Asteraceae, nativo do nordeste do Paraguai, com ocorrência natural também nas regiões vizinhas pertencentes ao território brasileiro e argentino (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). Embora rara no seu habitat natural, o cultivo comercial de estévia, especialmente na América do Sul e Ásia, bem como uso ornamental na Europa e América do Norte, tem feito a ocorrência da espécie no mundo mais comum do que jamais fora (BRANDLE e TELMER, 2007).

O interesse no cultivo desta espécie está relacionado ao fato de produzir elevados teores de metabólitos secundários, denominados glicosídeos diterpênicos, em suas folhas. Estas substâncias, também chamadas de glicosídeos de esteviol, são caracterizadas pelo alto potencial edulcorante (até 400 vezes superior à sacarose) e ausência de valor calórico (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012; MANDAL *et al.*, 2013).

Já foram isolados e identificados mais de 30 glicosídeos de esteviol em concentrações variáveis (WÖLWER-RIECK, 2012), que podem representar, em cultivares especializadas e condições adequadas de cultivo, mais de 70% da biomassa seca das folhas (OHTA *et al.*, 2010).

Dentre os glicosídeos diterpênicos, o esteviosídeo e rebaudiosídeo A são os produzidos em maior quantidade na planta, e, portanto, possuem maior importância comercial. Além de sensorialmente mais doce, o rebaudiosídeo A não apresenta sabor amargo residual, característico do esteviosídeo, possuindo, dessa forma, valor de mercado mais elevado (GOTO e CLEMENTE, 1998). Programas de melhoramento para estévia têm focado justamente na maior produção de folhas e concentração maior de rebaudiosídeo A, visando aumentar a relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo, característica desejável para a indústria (YADAV *et al.*, 2011).

A nível global estimava-se uma movimentação de 11 bilhões de dólares no ano de 2015 em produtos de estévia (ANKIT, 2014). Considerando o contexto brasileiro, a produção não é suficiente para suprir a demanda interna, sendo registrada uma importação de mais de 3 milhões de dólares em produtos oriundos da planta no ano de 2016 (BRASIL, 2017). Considerando o potencial produtivo e

econômico da espécie, são, portanto, necessários estudos no sentido de subsidiar o cultivo em território brasileiro e identificar práticas de manejo que afetem positivamente a produção das substâncias edulcorantes.

A produção de glicosídeos de esteviol pode ser influenciada por diversos fatores, dentre os quais se destacam a fase ontogenética, fotoperíodo, distribuição espacial no perfil da planta, temperatura, disponibilidade de nutrientes e radiação (BONDAREV *et al.*, 2003; CEUNEN e GEUNS, 2013b).

Segundo Brandle e Rosa (1992) o principal fator que afeta o teor de glicosídeos diterpênicos em estêvia é o florescimento. De modo geral, a máxima produção destas substâncias é observada no início do florescimento, com tendência a drástica redução após este período (LIMA-FILHO, 2004; CEUNEN e GEUNS, 2013b; YANG *et al.*, 2015).

Quanto à distribuição espacial no perfil da planta, normalmente, o conteúdo de glicosídeos é maior em folhas jovens em crescimento próximas ao ápice, apresentando decréscimo constante em direção às folhas basais senescentes. No entanto, padrão diferente é observado em plantas sob condições de dias curtos. Estas plantas tendem a apresentar maior acúmulo de glicosídeos de esteviol em folhas do terço mediano e níveis menores próximo do ápice e base da planta (CEUNEN e GEUNS, 2013a; 2013b).

Além do fotoperíodo, a dinâmica da radiação ao longo do dossel é um dos fatores que pode influenciar a produção de moléculas edulcorantes em condições de campo. Em cultivos com maior capacidade de interceptação de radiação fotossinteticamente ativa existe um aumento no total de assimilados disponíveis para distribuição nas folhas (KUMAR *et al.*, 2014a). Nesse sentido, o espaçamento tende a exercer função tanto na produção de biomassa quanto no acúmulo de glicosídeos diterpênicos, pela influência na radiação incidente ao longo do perfil da planta e por unidade de área.

Além da influência na produtividade, modificações na dinâmica da radiação podem também ocasionar adaptações anatômicas em espécies vegetais, como alterações na espessura da folha, densidade estomática, número e tamanho das células epidérmicas, densidade de tricomas, tamanho dos espaços intercelulares, entre outros (CASTRO *et al.*, 2007; LAMBERS *et al.*, 2008). Em estêvia, algumas destas características, especialmente a densidade de tricomas no limbo foliar, apresentaram correlação com a produção de glicosídeos de esteviol (BONDAREV *et*

*al.*, 2010), o que torna importante seu estudo para elucidação dos mecanismos de resposta às práticas de manejo e condições ambientais.

O conteúdo de glicosídeos diterpênicos, especialmente de esteviosídeo, é positivamente correlacionado com a biomassa de folhas (METIVIER e VIANA, 1979), que, por sua vez, depende de práticas agrícolas como a aplicação de fertilizantes (MANDAL *et al.*, 2013).

Uma das alternativas tecnológicas para aperfeiçoar a absorção de nutrientes é o uso de fertilizantes de liberação lenta ou controlada (LIANG e LIU, 2006). Estes fertilizantes permitem prolongar de maneira significativa o tempo de liberação dos nutrientes para absorção e uso pelas plantas, em relação às fontes solúveis tradicionais (TRENKEL, 1997). Apesar de serem relativamente abundantes pesquisas relacionadas a aspectos nutricionais em estêvia (LIMA-FILHO e MALAVOLTA, 1997; LIMA-FILHO *et al.*, 1997 a; LIMA-FILHO *et al.*, 1997 b; JARMA *et al.* 2010; PATIL, 2010; MANDAL *et al.*, 2013; PAL *et al.*, 2013; PAL *et al.*, 2015 a; TAVARINI *et al.*, 2016), não são encontrados na literatura relatos sobre a aplicação de fertilizantes de liberação controlada, seus efeitos no metabolismo secundário e suas implicações produtivas na espécie.

Diante do exposto, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar a influência de épocas de colheita, espaçamentos e aplicação de fertilizante de liberação controlada nos aspectos fisiológicos, morfológicos e produtivos de um acesso de *S. rebaudiana*.

A presente dissertação se organiza em sete capítulos, sendo o capítulo 1 referente à introdução geral, o capítulo 2 correspondente à revisão de literatura, capítulos 3, 4, 5 e 6 referentes à apresentação e discussão dos dados obtidos a partir dos experimentos e um sétimo e último capítulo contendo as considerações finais. A revisão de literatura aborda os aspectos históricos, botânicos, ecológicos, fitoquímicos e agrônômicos da espécie *Stevia rebaudiana*, e visa subsidiar o entendimento e discussão do tema do trabalho como um todo e nas especificidades dos capítulos referentes aos experimentos.

Os capítulos 3 e 4 consistem da apresentação e discussão de resultados obtidos com um experimento de campo realizado na cidade Pinhais/PR. O capítulo 3 versa sobre a influência de diferentes espaçamentos e épocas de colheita nos aspectos fisiológicos e produtivos da espécie, enquanto que o capítulo 4 visa descrever o efeito de diferentes espaçamentos no acúmulo de biomassa,

adaptações morfológicas e fisiológicas, e distribuição de compostos ao longo do perfil da planta.

Os capítulos 5 e 6 são referentes a um estudo realizado em condições de casa de vegetação com objetivo de avaliar os efeitos da aplicação de diferentes doses de fertilizante de liberação controlada nos aspectos nutricionais, fisiológicos e produtivos de um acesso estévia. O capítulo 5 é um estudo de como a aplicação do fertilizante afeta o acúmulo de macronutrientes, sua partição e eficiência de utilização em folhas e ramos do referido acesso. O capítulo 6 visa avaliar os efeitos do fertilizante nos aspectos fisiológicos e produtivos da espécie, com ênfase na produção de rebaudiosídeo A e esteviosídeo. As considerações finais visam sintetizar as principais respostas obtidas com o desenvolvimento do trabalho, bem como sugerir estudos futuros para melhor compreensão da dinâmica produtiva da espécie.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

A espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni é originária das regiões dos planaltos de Amambay na vale do rio Monday, nordeste do Paraguai na fronteira com o Brasil. Quando os conquistadores espanhóis aportaram na América do Sul observaram a existência e utilização da planta pelos nativos, e, mais tarde, constatou-se que durante séculos as tribos Guaraní dos dois países usaram a espécie para adoçar bebidas medicamentosas, especialmente o mate cozido. Nestas tribos a planta recebe a nomenclatura de ka'a he', que traduzida significa erva doce (LIMA-FILHO *et al.*, 2004; BRANDLE e TELMER, 2007; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

A planta foi inicialmente classificada em 1899 pelo naturalista suíço, radicado no Paraguai, Moisés Santiago Bertoni (1857-1929), que obteve referência da planta de ervateiros e índios da região do Amambay em uma de suas viagens ao leste do Paraguai em 1887. Bertoni, por meio de uma porção de ramos e fragmentos de inflorescência, classificou a planta inicialmente como *Eupatorium rebaudianum* Bert. em homenagem ao químico paraguaio Ovídio Rebaudi, primeiro a estudar as substâncias químicas da planta (BERTONI, 1905; LIMA-FILHO *et al.*, 2004; YADAV *et al.*, 2011).

O Cônsul britânico em Assunção, C. Gosling descreveu a planta mais detalhadamente e enviou amostras de material vegetal para a Inglaterra, quando verificou-se que a planta pertencia ao gênero *Stevia*. Em 1905 o nome foi oficialmente alterado para *Stevia rebaudiana* Bertoni (LIMA-FILHO *et al.*, 2004; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

O princípio edulcorante foi isolado pela primeira vez em 1909 e apenas em 1931 o extrato foi purificado e isolado o esteviosídeo, cuja estrutura química foi estabelecida em 1952 como um glicosídeo diterpênico. Durante os anos 70, outros compostos foram isolados, inclusive o rebaudiosídeo-A (BARRIOCANAL *et al.*, 2008; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

Quanto ao cultivo, entre 1942 e 1943 foram enviadas sementes da espécie para áreas de clima mais ameno do Reino Unido, tendo sido cultivadas nos condados de Devon e Cornwall (LIMA-FILHO *et al.*, 2004), não obtendo sucesso no estabelecimento de um sistema produtivo (LEWIS, 1992; BRANDLE *et al.*, 1998).

Em 1968 foi exportada para o Japão e desde então o cultivo tem se espalhado por diversas regiões do mundo (SUMIDA, 1968; LEWIS, 1992; BRANDLE *et al.*, 1998; YADAV *et al.*, 2011).

## 2.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

O gênero *Stevia* compreende cerca de 200 espécies de ervas e arbustos na família *Asteraceae* (MISHRA *et al.*, 2010). A espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni se destaca entre as do gênero por produzir glicosídeos diterpênicos com propriedades edulcorantes. A planta pode atingir mais de 1 metro de altura, possui um extenso sistema radicular (YADAV *et al.*, 2011). O caule é ereto, frágil e ramificado, podendo ou não ser pubescente (SERFATY *et al.*, 2013).

O sistema radicular da estêvia é pivotante no início do desenvolvimento. Após o primeiro corte verifica-se uma diferenciação celular na região do coleto e o sistema radicular torna-se fasciculado, com distribuição maior em camadas superiores do solo (KINGHORN, 2002; LIMA-FILHO *et al.*, 2004).

As folhas são sésseis, lanceoladas ou espatuladas com margem serrilhada do meio para a ponta, tendo comprimento médio de 3 a 4 centímetros (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012), podendo chegar a 6 cm com largura de 2,5 cm, disposição oposta, alterna apenas quando junto da inflorescência, e venação actinódrama (BRASIL, 2010).

A epiderme foliar é composta de células isodiamétricas cobertas com uma camada fina de cutícula. Células da epiderme adaxial são maiores e possuem menos contornos curvos do que as da epiderme abaxial. Os estômatos são do tipo anomocítico e estão presentes em ambas as superfícies da folha, porém, em número significativamente maior na superfície abaxial. São observados três tipos de estruturas epidérmicas na superfície das folhas tricomas tectores grandes, tricomas tectores pequenos e tricomas glandulares. Os tricomas tectores grandes possuem forma cônica e são compostos por sete a dez células, com comprimento entre 300 a 500  $\mu\text{M}$ . Os tricomas tectores pequenos, por sua vez, são compostos de cinco ou seis células com comprimento entre 80 a 150  $\mu\text{M}$ . Considerando o perfil da planta, a densidade de tricomas é maior nas folhas apicais em relação às basais (BONDAREV *et al.*, 2010).

Os tricomas glandulares, encontrados em ambas as superfícies da folha são principalmente do tipo decacelular bisseriado, composto por cinco pares de células: um par de células basais, outro de células pedunculares e três pares de células secretoras da cabeça. Tricomas glandulares em desenvolvimento, ainda com duas células, já ocorrem em primórdios foliares do segundo par e, frequentemente, estão em fase madura em folhas ainda em expansão. O material de secreção, liberado pelas células da cabeça, é armazenado no espaço subcuticular do tricoma, sendo majoritariamente de natureza lipofílica (MONTEIRO *et al.*, 2001).

O parênquima paliçádico é formado por uma ou duas camadas. Quando duas camadas, estas abrangem a metade da espessura da lâmina. O parênquima esponjoso apresenta vários estratos, dispostos irregularmente. Os feixes vasculares secundários são colaterais, circundados por uma bainha parenquimática clorofilada. O sistema vascular é representado por um feixe vascular colateral, envolvido parcialmente por fibras esclerenquimáticas junto ao xilema e ao floema, em forma de calotas (BRASIL, 2010).

As flores são hermafroditas, de tamanho pequeno, variando de 15 a 17 mm, brancas e reunidas em capítulos com 5 a 6 brácteas no entorno. Os capítulos, por sua vez, se organizam em inflorescências corimbiformes (BRASIL, 2010; YADAV *et al.*, 2011; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). Uma inflorescência madura de estévia possui cerca de 190 capítulos, sendo que aproximadamente 10% dos mesmos se abrem simultaneamente. O androceu consiste de cinco estames soldados pelas anteras (sinantero) formando um tubo ao redor dos estiletes. As anteras possuem duas tecas introrsas com deiscência longitudinal (CAPONIO *et al.*, 2016).

Frutos apresentam-se como aquênios fusiformes possuindo 4 ou 5 ângulos longitudinais, com cerca de 3 mm de comprimento com superfície pilosa, e papus formado por uma só fileira de cerdas (GOETTEMÖLLER e CHING, 1999; LIMA-FILHO *et al.*, 2004; BRASIL, 2010; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

As sementes são muito pequenas, com peso de 1000 sementes variando de 0,3 a 1,0 g, sendo dispersas pelo vento por meio de papus. As sementes férteis são geralmente de cor escura, enquanto as sementes de cor mais pálida são usualmente estéreis (YADAV *et al.*, 2011).

## 2.3 ASPECTOS ECOLÓGICOS

O gênero *Stevia* é endêmico do continente americano, com ocorrência do sudeste dos Estados Unidos ao norte da Argentina, particularmente ao longo das montanhas Andinas. Consiste num grupo de ervas, subarbustos e arbustos perenes ou anuais que ocorrem em regiões montanhosas, florestas abertas, beiras de rios e vales secos. Estima-se que existam cerca de 120 espécies nativas da América do Sul (LIMA-FILHO *et al.*, 2004; YADAV *et al.*, 2011).

A espécie *Stevia rebaudiana* é nativa da região do vale do Rio Monday nos planaltos do nordeste do Paraguai, também ocorrendo naturalmente nas regiões vizinhas em território brasileiro e argentino entre latitudes de 23" e 26" S. A região está localizada em altitude de 200 a 500 metros acima do nível do mar, com temperaturas variando de – 6,0 a 43°C, com média anual de 23°C (BRANDLE e ROSA, 1992; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2013).

A ocorrência da espécie se dá em bordas de pântanos, próxima de córregos ou em áreas de vegetação rasteira em solos com lençol freático mais superficial (SHOCK, 1982; BRANDLE *et al.*, 1998; YADAV *et al.*, 2011). A planta apresenta preferência por solos arenosos (AHMED *et al.*, 2011), todavia, segundo Lemus-Mondaca *et al.* (2012), se desenvolve bem em uma vasta gama de solos desde que forneçam um suprimento razoável de umidade e drenagem adequada.

A planta cresce naturalmente em áreas com precipitação anual variando entre 1500 a 1800 mm por ano em clima subtropical semi-úmido, possuindo uma necessidade hídrica relativamente alta para seu crescimento e desenvolvimento. As folhas e caules murcham rapidamente em condições de déficit hídrico, mas possuem recuperação rápida no caso de estresses não prolongados (YADAV *et al.*, 2011; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

As temperaturas ideais para rápido desenvolvimento desta espécie se situam entre 20 a 24°C. A estévia não se desenvolve bem em baixas temperaturas e usualmente não resiste a temperaturas abaixo dos 9°C (SINGH e RAO, 2005). Segundo Ramesh *et al.* (2007) a espécie não tolera geadas, cessando seu crescimento durante o inverno. Moraes *et al.* (2013) relataram danos totais de parte aérea da cultura quando exposta à temperaturas inferiores à 0,0°C, todavia com recuperação após o período frio, e viabilidade de colheita na estação seguinte.

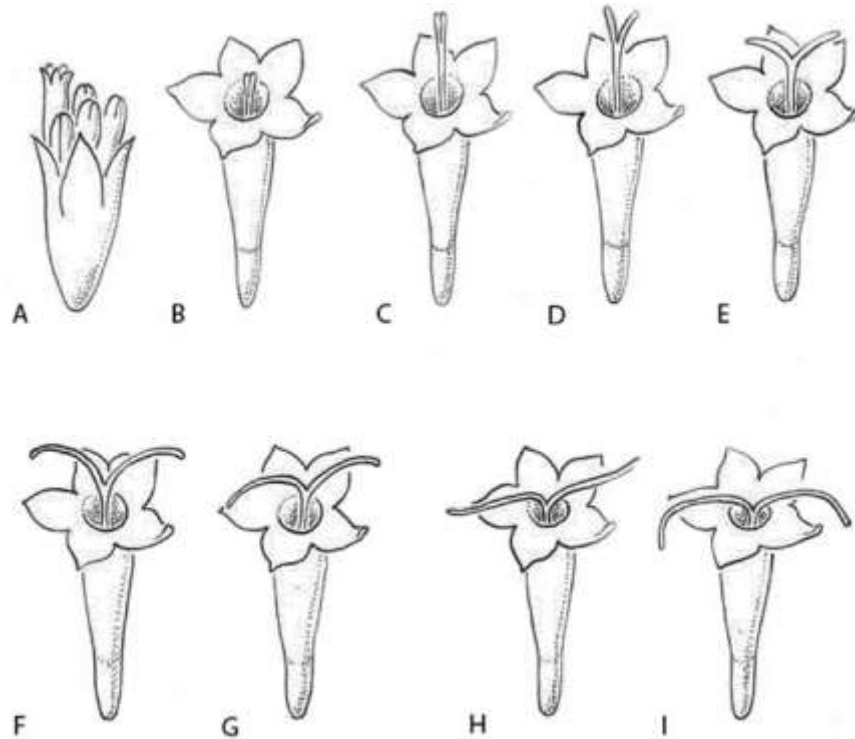
A fenologia da cultura varia bastante, especialmente em função de diferentes fotoperíodos. Em experimento realizado na Colômbia, Correa *et al.* (2008) verificaram emergência das plântulas 7 dias após a semeadura (DAS), com primeiro par de folhas verdadeiras aos 17 DAS, florescimento aos 71 DAS, frutificação aos 115 DAS, e início de senescência no 169º dia após a semeadura, como ciclo total de 201 dias até rebrote do cultivo.

*S. rebaudiana* floresce quando o comprimento do dia é menor que 13 a 14 horas, sugerindo que seja uma planta de dia curto (VALIO & ROCHA, 1977; CRUZ, 2015). De acordo com estudos realizados por Valio e Rocha (1977) um mínimo de 2 ciclos de dias curtos é necessário para indução de florescimento, sendo possível apenas em plantas no estágio de 4 pares de folhas totalmente expandidas em diante. A cultura floresce entre janeiro e março no hemisfério sul e entre setembro e dezembro no hemisfério norte (AHMED *et al.*, 2011; YADAV *et al.*, 2011).

A concentração de esteviosídeo nas folhas de estévia aumenta quando as plantas são submetidas a dias longos. Uma vez que a síntese de glicosídeos é reduzida no florescimento, atraso nesta fase com indução por dias longos permite um maior acúmulo destes metabólitos, bem como maior produção de biomassa pelo aumento do período vegetativo (BRANDLE *et al.*, 1998; SERFATY *et al.*, 2013).

Uma alternativa produtiva em condições ambientais de dias curtos é a interrupção do período de escuro com cinco minutos de luz vermelha para estímulo da conversão de fitocromo R em fitocromo F, induzindo crescimento vegetativo e acúmulo de glicosídeos de esteviol. Tratamentos com luz de LED vermelha dobraram a produção de glicosídeos em *S. rebaudiana* cultivada em condições de dias curtos, tendo sido considerado um método prático e de baixo custo para aumentar as produções de biomassa e teores de compostos adoçantes (CEUNEN *et al.*, 2012).

Na ocasião do florescimento, observa-se que a abertura das flores no capítulo não é simultânea, e, como acontece na maioria das asteráceas, ocorre sequencialmente em dois ou três dias (Figura 1). Considerando os 190 capítulos em diferentes fases, a planta leva mais de um mês para passar pelos vários estádios florais de desenvolvimento e produzir todas as suas flores (RAMESH *et al.*, 2006; YADAV *et al.*, 2011; CAPONIO *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Fenologia da floração e receptividade estigmática de *Stevia rebaudiana*. A: Abertura das flores no capítulo de forma sequenciada. B: Comprimento dos estigmas no momento da antese. C-D: estigmas 2 horas após a antese. E-G: posição dos ramos estigmáticos 5 horas após a antese. H-I: Ramos estigmáticos com maior receptividade a partir de 24 horas após a antese. Fonte: Traduzido de CAPONIO *et al.* (2016).

A antese começa quando o estilo emerge entre as anteras e as pétalas se encontram expandidas, processo que ocorre entre 09:30 e 11:00 h dependendo do comprimento do dia. O pólen permanece sobre a superfície externa do estilo por um período aproximado de 2 a 4 horas. Observa-se que flores não polinizadas mantêm seus estilos e ramos estigmáticos sem murchar por mais de 7 dias após terem emergido, enquanto que os polinizados começam a murchar em 24 horas. (CAPONIO *et al.*, 2016).

A diferenciação de uma região de receptividade menor que o comprimento dos ramos estigmáticos e a presença de um sistema genético de auto-incompatibilidade sustentam que a espécie é essencialmente alógama, sendo provavelmente polinizada por insetos (GOETTEMÖLLER e CHING, 1999; CAPONIO *et al.*, 2016). Estudos demonstram que, a polinização cruzada e a abundância de insetos, como Apidae e Syrphidae, desempenham um papel crucial para aumentar o rendimento e qualidade de sementes de estêvia (ÖZYİĞİT *et al.*, 2015; MARTINI *et al.*, 2016).

As sementes são anemocóricas, e normalmente apresentam baixo potencial germinativo. O que limita, em partes, cultivos em larga escala. Sementes de coloração clara são usualmente inférteis, enquanto que as viáveis são de coloração marrom-escura. (SHOCK, 1982; CARNEIRO *et al.*, 1997; GOETMELLER E CHING, 1999; YADAV *et al.*, 2011; LEMUS- MONDACA *et al.*, 2012).

Condições ambientais são extremamente influentes na produção de sementes em *S. rebaudiana*. Dentre os principais fatores que afetam a produtividade e potencial germinativo estão a presença de abelhas, fator fundamental nos cultivos para produção de sementes viáveis (ÖZYİĞİT *et al.*, 2015); a aplicação de luz de LED azul, que aumenta o potencial germinativo das sementes, número de folhas, de estômatos e abertura estomática em mudas (SIMLAT *et al.*, 2016); a temperatura, mais adequada em torno de 25°C, promovendo porcentagens de germinação de até 63,21% (TAKAHASHI *et al.*, 1996); e a presença de chuvas intensas no período de florescimento, que reduz a produtividade e potencial germinativo das sementes (MADAN *et al.*, 2010).

A função ecológica dos glicosídeos de esteviol ainda não é conhecida com precisão, mas sua alta concentração na folha e a conservação da rota biossintética na espécie indica que, em algum ponto na evolução, sua presença conferiu vantagem significativa aos indivíduos que os possuíam (YADAV *et al.*, 2011).

Alguns pesquisadores inferem que estes metabólitos possuam algum efeito dissuasor sobre afídios, sugerindo um clássico papel na defesa química contra insetos (NANAYAKKARA *et al.*, 1987; SMITH e VAN-STADIN, 1992). Harada *et al.* (1993) demonstraram que as substâncias adoçantes de *S. rebaudiana* atraem animais aquáticos, o que, se extrapolado para animais herbívoros terrestres, pode estar associado com desnutrição e efeitos negativos na sobrevivência, uma vez que estes metabólitos não possuem valor calórico (BRANDLE e TELMER, 2007).

Outra hipótese para o acúmulo destes compostos é o de consistirem em uma maneira elaborada de controlar os níveis de ácido giberélico na planta (SMITH e VAN-STADIN, 1992). Observando a porcentagem de acumulação de glicosídeos em relação à massa seca da planta, fica claro que uma larga fração do metabolismo é ligada à síntese dessas moléculas estruturalmente complexas. As concentrações de giberelinas são cerca de dez mil vezes mais baixas que os glicosídeos de esteviol, mesmo sendo estruturalmente relacionados e compartilhando da mesma rota biossintética em fases iniciais. As diferenças observadas nas quantidades

relativas dos compostos podem ser explicadas por profundas mudanças na regulação da expressão das enzimas copalylphosphate sintase e caureno sintase nas folhas, que permitem a síntese e acumulação de edulcorantes. O fato dos níveis de expressão serem mais altos em tecidos maduros em comparação com tecidos jovens em crescimento rápido levanta a possibilidade de separações espaciais e temporais, que evitam uma sobreposição nas sínteses de esteviol e giberelinas (RICHMAN *et al.*, 1999; GEUNS, 2003).

É possível também que os glicosídeos de esteviol não tenham uma real função adaptativa, e, em vez disso, sejam parte de alguma diversificação química não selecionada cuja contribuição para a propagação e sobrevivência da espécie tenha sido simplesmente pelas propriedades adoçantes. A atração dos humanos pelo sabor doce permitiu à espécie, mais do que outras adaptações evolutivas, se espalhar em cultivos pelo mundo, sendo sua ocorrência atualmente mais comum do que jamais fora (FIRN E JONES, 2003; BRANDLE e TELMER, 2007).

## 2.4 ASPECTOS FITOQUÍMICOS

A estévia é conhecida especialmente pela produção de glicosídeos diterpênicos, também chamados glicosídeos de esteviol, em suas folhas. Estes glicosídeos são os responsáveis pelo sabor doce característico da planta (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). Glicosídeo é o nome dado aos compostos que contêm uma molécula de carboidrato (açúcar) ligado à uma porção não carboidrato (aglicona). Os glicosídeos são encontrados principalmente em plantas e podem ser convertidos por clivagem hidrolítica em uma molécula de açúcar e uma aglicona (BERNAL *et al.*, 2011).

No caso de *Stevia rebaudiana*, a aglicona é chamada esteviol, ácido ent-13-hydroxykaur-16-en-18-oico (BRANDLE *et al.*, 1998). A molécula de esteviol é um diterpeno cuja rota de síntese se inicia paralelamente à de giberelinas, pela via dependente de mevalonato. A condensação de moléculas de difosfato de dimetilalilo (DMAPP) e pirofosfato de isopentenilo (IPP) resulta na geração de geranylgeranyl difosfato (GGPP), que é ciclicizado e rearranjado em ent-caureno, etapas que ocorrem no cloroplasto. O ent-caureno é então oxidado nos passos seguintes, formando o ácido ent-caurenóico no retículo endoplasmático. O ponto onde a biossíntese de giberelinas e esteviol diverge é na hidroxilação do ácido ent-



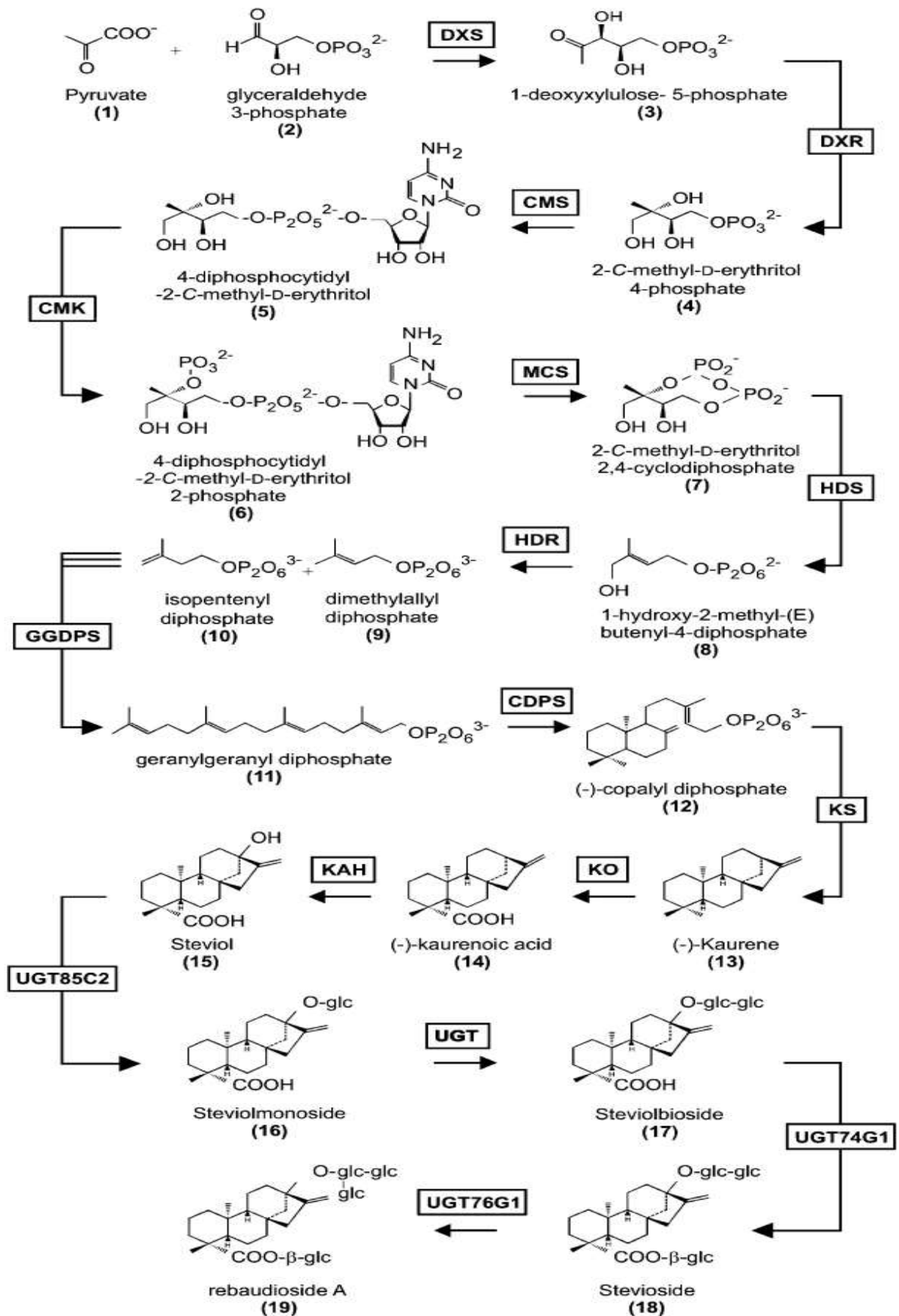
caurenoico no C-13, que forma o esteviol. A via termina com a glicosilação do esteviol catalisada por UGT's (*uridinediphosphatedependent glycosyltransferase*), formando rebaudiosídeo A e outros glicosídeos diterpênicos (TOTTÉ *et al.*, 2000; BRANDLE e TELMER, 2007; CEUNEN e GEUNS, 2013c; YANG *et al.*, 2015). A figura 02 apresenta o esquema da via de síntese de glicosídeos de esteviol.

Segundo Brandle e Telmer (2007), das cerca de 230 espécies do gênero *Stevia*, apenas as espécies *S. rebaudiana* e *S. phlebophylla*, produzem estes compostos. Carakostas *et al.* (2008), todavia, relatam que além destas espécies, *Stevia dianthoidea*, *S. anisostemma*, *S. bertholdii*, *S. crenata*, *S. enigmatica*, *S. eupatoria*, *S. lemmonii*, *S. micrantha*, *S. plummerae*, *S. salicifolia*, *S. serrata* e *S. viscida* também possuem potencial edulcorante. É consenso, no entanto, que *S. rebaudiana* produz os níveis mais altos de glicosídeos de esteviol.

*S. rebaudiana* acumula mais de 30 glicosídeos de esteviol em concentrações variáveis (WÖLWER-RIECK, 2012). Para a cultivar Morita, por exemplo, registraram-se porcentagens de mais de 70% de glicosídeos diterpênicos na massa seca das folhas (OHTA *et al.* 2010). Destes mais de 30 glicosídeos, podem ser considerados os principais o esteviosídeo, esteviobiosídeo, rebaudiosídeo A, B, C, D, E, F e dulcosídeo. A presença de compostos como esteviobiosídeo e rebaudiosídeo B nos extratos pode ser ocasionada pelo processo de extração e não pela ocorrência natural (GEUNS, 2003). Os glicosídeos de maior importância comercial são o esteviosídeo e rebaudiosídeo A.

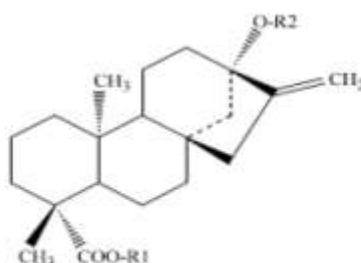
Os glicosídeos diterpênicos isolados de *S. rebaudiana* tem a mesma estrutura de esteviol, diferindo principalmente nos conteúdos de resíduos de carboidratos (R1 e R2), mono, di e trissacarídeos contendo glicose e/ou ramnose no Carbono 13 e 19 (KOCHIKYAN *et al.*, 2006). A estrutura dos principais glicosídeos diterpênicos presentes em estévia é apresentada na figura 3.

Qualquer um dos principais compostos edulcorantes de estévia é sensorialmente mais doce que sacarose: rebaudiosídeo A, 250 a 450 vezes; rebaudiosídeo B, 300 a 350 vezes; rebaudiosídeo C, 50 a 120 vezes; rebaudiosídeo D 250 a 450 vezes; rebaudiosídeo E, 150 a 300 vezes; dulcosídeo A 50 a 120 vezes; esteviobiosídeo 100 a 125 vezes e esteviosídeo 300 vezes (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Biossíntese de glicosídeos de esteviol em estévia (BRANDLE e TELMER, 2007).

Além da diferença na doçura, algumas outras propriedades também variam entre os glicosídeos de esteviol. Comparando-se os dois principais com valor comercial, rebaudiosídeo A e esteviosídeo, registra-se que, além de ser mais doce, o rebaudiosídeo A não apresenta sabor amargo residual característico do esteviosídeo, possuindo dessa forma valor comercial mais elevado (GOTO e CLEMENTE, 1998). Programas de melhoramento para estévia têm focado justamente na maior produção de folhas e concentração maior de rebaudiosídeo A, visando aumentar a relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo, característica desejável para a indústria (YADAV *et al.*, 2011).



Nome do Composto		R1	R2
1	Esteviol	H	H
2	Esteviolbiosídeo	H	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
3	Esteviosídeo	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
4	Rebaudiosídeo A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)   $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
5	Rebaudiosídeo B	H	$\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)   $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2 $\rightarrow$ 1)
6	Rebaudiosídeo C	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)   $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
7	Rebaudiosídeo D	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	$\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)   $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
8	Rebaudiosídeo E	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\beta$ -Xyl(2 $\rightarrow$ 1)   $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2 $\rightarrow$ 1)
9	Rebaudiosídeo F	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Xyl(2 $\rightarrow$ 1)   $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2 $\rightarrow$ 1)
10	Dulcosídeo A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2 $\rightarrow$ 1)

**Figura 3.** Estrutura dos principais glicosídeos diterpênicos de *Stevia rebaudiana*. Glc, Xyl e Rha representam, respectivamente Glicose, Xilose e Ramnose (Adaptado de GEUNS, 2003).

A regulação da produção destes compostos na planta se dá notadamente pela fase ontogenética, pelo fotoperíodo, pela distribuição espacial no perfil da planta (CEUNEN e GEUNS, 2013c).

Ceunen e Geuns (2013a) avaliaram a flutuação nos teores de glicose e sacarose livres nas folhas de estévia durante o dia e sua correlação com a produção de glicosídeos diterpênicos em função de fotoperíodos. Os teores de glicose e sacarose nas folhas decresceram mais de três vezes durante a noite, enquanto que teores de glicosídeos de esteviol não mostraram nenhuma flutuação significativa durante o período de 24 horas. Variações ontogenéticas nos teores de glicose foram marcadamente diferentes sob dias curtos e dias longos. Sob dias longos o teor de glicose aumentou cerca de duas vezes depois do início da formação do botão floral, enquanto que em dias curtos houve estagnação ou pequeno decréscimo. Esse acréscimo sob dia longo foi especialmente verificado nas folhas dreno superiores no fim do período vegetativo, possivelmente agindo como um sinal metabólico para transição da fase para o desenvolvimento reprodutivo. Apesar da variabilidade dos níveis dos compostos edulcorantes, observou-se uma diminuição em todas as condições após a abertura da flor, o que pode estar relacionado com uma diminuição da transcrição dos genes biossintéticos envolvidos (CEUNEN e GEUNS, 2013a).

Para melhor elucidar os efeitos do fotoperíodo e das fases de desenvolvimento na transcrição de genes envolvidos na produção de glicosídeos de esteviol, Yang *et al.* (2015) realizaram ensaios para avaliação do nível transcricional de 15 genes responsáveis pela produção de enzimas chave na rota biossintética dos compostos edulcorantes. Não foram encontradas diferenças na expressão de genes da rota de síntese de glicosídeos nos fotoperíodos avaliados (8 horas de luz/16 horas de escuro; 10 horas de luz/14 horas de escuro; 14 horas de luz/10 horas de escuro; e 16 horas de luz/8 horas de escuro). Todavia, evidentes alterações foram observadas no perfil transcricional em função das fases de desenvolvimento.

O aumento dos teores das substâncias edulcorantes no início do florescimento está positivamente correlacionado com o aumento na transcrição dos genes relacionados. Todos os genes avaliados foram transcritos minimamente em período de crescimento vegetativo, e, boa parte apresentou picos de expressão após o aparecimento do botão floral, dentre estes o *SrUGT74G1*, que codifica a

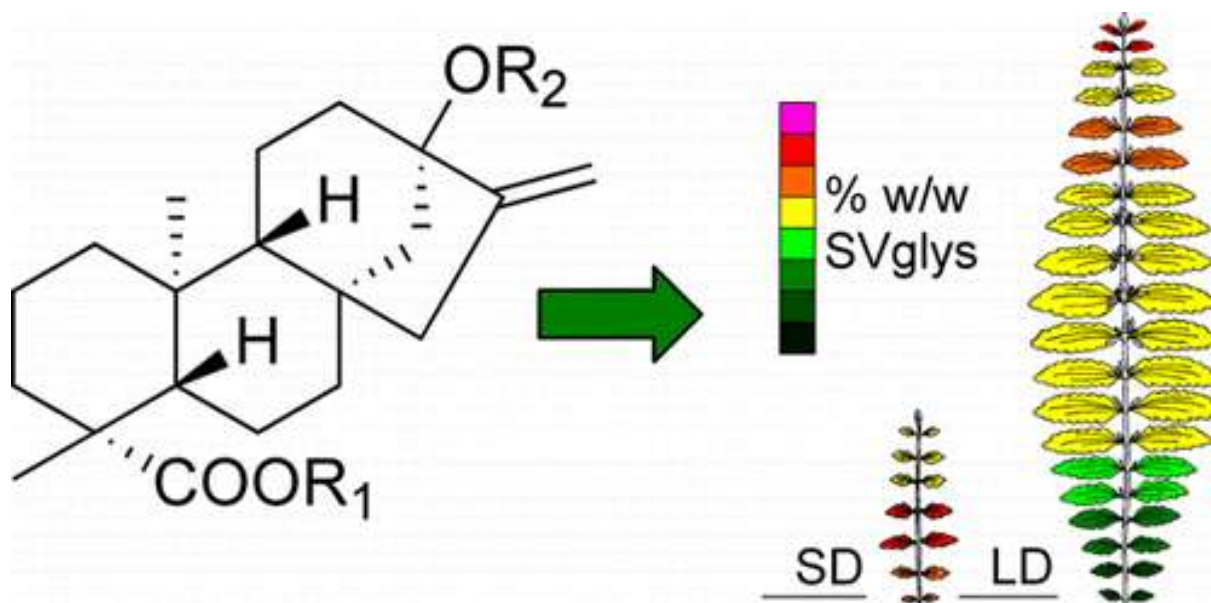
UGT responsável pela síntese de esteviosídeo. Os genes *SrIDI*, *SrKO1* e *SrUGT85C2* (responsáveis pelas enzimas que catalisam a biossíntese de dimetilalil difosfato, ácido caurenóico e esteviomonosídeo, respectivamente) atingiram um pico de transcrição na fase de plena floração (YANG *et al.*, 2015).

Considerando a via de síntese compartilhada nas fases iniciais, os autores sugerem que a transcrição crescente de genes de biossíntese de giberelinas no estágio de aparecimento de botões florais fornece mais precursores para a biossíntese de glicosídeos de esteviol, o que explica o aumento dos teores em relação ao período vegetativo. Como ocorre, todavia, a diminuição da produção destes compostos após o florescimento aparenta ser um mecanismo mais complexo que ainda está por ser caracterizado (YANG *et al.*, 2015).

Algumas hipóteses para esta redução no acúmulo de glicosídeos de esteviol com o progresso da floração são relacionadas à presença de folhas senescentes com baixos teores destas substâncias (KALANDIA *et al.*, 2004), a remobilização para os órgãos reprodutivos (BONDAREV *et al.*, 2003), ou, ainda um catabolismo *in situ* por glicosidases endógenas (MADORE, 2000), embora boa parte destas suposições tenham sido recentemente contestadas (CEUNEN e GEUNS, 2013b).

É notável, no entanto, que o nível de transcrição dos 15 genes foi mínimo no período de rápido crescimento vegetativo e exibiu aumento notável na fase de formação do botão floral e período de florescimento, confirmado a regulação transcricional da produção de glicosídeos de esteviol nas diferentes fases de desenvolvimento da cultura (YANG *et al.*, 2015). O conhecimento dos genes que regulam a síntese de glicosídeos é de extrema importância tanto para a compreensão dos mecanismos fisiológicos da produção destes compostos quanto para aplicação em programas de melhoramento vegetal.

Os teores de glicosídeos de esteviol não apenas mudam ao longo da ontogenia, mas também diferem espacialmente no dossel da cultura. Normalmente o conteúdo de glicosídeos é maior em folhas jovens em crescimento próximas ao ápice da planta apresentando decréscimo constante em direção às folhas basais senescentes. No entanto, padrão diferente é observado em plantas em florescimento sob condições de dias curtos (8 horas de luz), apresentando maior acúmulo de glicosídeos de esteviol em folhas do terço mediano e níveis menores próximo do ápice e base da planta, conforme esquematizado na figura 04 (CEUNEN e GEUNS, 2013b; 2013c).



**Figura 4.** Distribuição espacial do acúmulo de glicosídeos de esteviol (SVglys) em estêvia sob dias curtos (SD) e dias longos (LD) (CEUNEN e GEUNS, 2013b).

Kumar *et al.* (2012) avaliaram a expressão de 15 genes e sua correlação com a produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em folhas do primeiro ao quinto nó. Os autores verificaram que folhas na posição do terceiro nó (considerando a folha apical como a primeira folha) apresentou maior teor de substâncias edulcorantes. Com exceção dos genes correspondentes às enzimas 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) e ent-kaurenoic acid oxidase (KO), que apresentaram picos nas folhas do terceiro nó, a expressão foi máxima nas folhas do primeiro nó e mínima no quinto nó. A expressão dos genes exibiu evidente redução em folhas maduras quando comparada com folhas jovens. A expressão de *SrKO* e *SrDXR* mostrou correlação positiva com a produção dos glicosídeos diterpênicos, sugerindo seu papel no controle do fluxo metabólico. A ausência de correlação entre o conteúdo de glicosídeos de esteviol e expressão dos demais genes no perfil da planta sugere que estes genes ou seus produtos podem não ser limitantes/regulatórios na distribuição espacial dos compostos na planta, como é observado em outras vias metabólicas, onde apenas alguns genes servem como reguladores (SINGH *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2012).

Diversos métodos são conhecidos para determinar o teor de glicosídeos em material vegetal. Todavia, o mais simples e mais confiável é o HPLC (*High Power Liquid Chromatography*), que vem sendo usado para determinar a composição de *S. rebaudiana* em vários lugares do mundo (KOVYLYAEVA *et al.*, 2007).

Com relação às propriedades dos compostos, esteviosídeo e rebaudiosídeo A são razoavelmente termoestáveis sob as elevadas temperaturas usadas no processamento de alimentos, não apresentando escurecimento ou caramelização quando aquecidos (ABOU-ARAB *et al.*, 2010).

São encontrados na literatura numerosos relatos de análise de óleo essencial de *Stevia rebaudiana*. Segundo Hossain *et al.* (2010) uma análise quantitativa do óleo essencial de folhas de estévia mostrou que mono e sesquiterpenos são os compostos majoritários, representando cerca de 50 dos 62 compostos identificados. Isoladamente os compostos encontrados em maior quantidade foram  $\alpha$ -cadinol (2,98%), espatulenol (2,21%), óxido de cariofileno (1,23%) e  $\beta$ -guaieno (0,32%) (HOSSAIN *et al.*, 2010; SIDDIQUE *et al.*, 2012).

Os teores de óleo essencial nas folhas secas variam entre 0,4 a 3,5%. As inflorescências podem produzir em média três vezes mais óleo essencial que as folhas. Óleos essenciais extraídos das inflorescências tendem a conter altas porcentagens de  $\beta$ -farneseno e nerolidol. Nas raízes, cerca de 60 componentes foram identificados, dos quais,  $\alpha$ -longipineno,  $\alpha$ -isocomeno, e modheph-2-eno são os mais representativos (FUJITA *et al.*, 1977; CEUNEN e GEUNS, 2013c).

As folhas de estévia contém quantidades consideráveis de proteína. Diversos trabalhos propuseram quantificar estas biomoléculas. Os valores variam de 9,8 g 100 g<sup>-1</sup> (SAVITA *et al.*, 2004) até 20,42 g 100 g<sup>-1</sup> (TADHANI E SUBHASH, 2006). As folhas também contém quase todos os aminoácidos essenciais, incluindo tirosina e cisteína, não ocorrendo apenas o triptofano. Isso significa que após a extração das moléculas edulcorantes, o resíduo pode ser uma valiosa fonte de aminoácidos indispensáveis para produtos alimentícios (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

Carboidratos são as principais fontes de energia e são componentes de diversas estruturas celulares. Os teores de carboidratos ou açúcares solúveis totais em folhas de estévia disponíveis na literatura, dentre os quais estão os glicosídeos diterpênicos (CARVALHO e ZAIDAN, 1999), variam de 35,2 a 61,9 mg g<sup>-1</sup> (BOONKAEWWAN *et al.*, 2006; ABOU-ARAB *et al.*, 2010; MARCINEK e KREJCIO, 2015).

*S. rebaudiana* contém quantidades substanciais de nutrientes minerais. Potássio, Cálcio, Magnésio e Sódio, que são nutricionalmente importantes, foram encontrados em razoável quantidade nas folhas de estévia. Zinco e Ferro também estão presentes. A alta quantidade de ferro nas folhas da planta conota a

possibilidade de a cultura ser utilizado para preparo de suplementos para combate à deficiência deste elemento, que é uma desordem importante especialmente em países em desenvolvimento (CHOUDHARY e BANDYOPADHYAY, 1999; ABOU-ARAB *et al.*, 2010).

Foram identificados seis ácidos graxos no óleo das folhas de estévia, ácido palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. As maiores concentrações foram de ácido palmítico (27,51 g 100 g<sup>-1</sup>) e as menores de ácido esteárico (1,18 g 100 g<sup>-1</sup>). Destaca-se a alta concentração de ácido linolênico (21,59 g 100 g<sup>-1</sup>) o que caracteriza a estévia como uma rica fonte desse importante ácido graxo (TADHANI e SUBHASH, 2006; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

## 2.5 ASPECTOS AGRONÔMICOS

Segundo Mishra *et al.* (2010), o solo para plantio deve ser lavrado e/ou cultivado duas vezes para proporcionar condições de desenvolvimento adequados à cultura. Apesar de ocorrer naturalmente em solos ácidos com pH por volta de 4, a planta se desenvolve melhor numa faixa entre 6,5 e 7,5 (SHOCK, 1982).

O plantio, para maiores produções de biomassa e compostos de interesse, deve ser feito na primavera (SERFATY *et al.*, 2013). No Hemisfério Sul, plantios realizados até meados de outubro são mais desejáveis, visando aumento na duração do período vegetativo, pois é quando se alcança o máximo da produção econômica (LIMA-FILHO, 2004; LIMA-FILHO *et al.*, 2004)

A produção de glicosídeos de esteviol é determinada tanto pela sua concentração nas partes de planta como pela biomassa total da mesma, sendo o desenvolvimento e a acumulação de biomassa marcadamente influenciados pelas condições ambientais (SERFATY *et al.*, 2013). Dentre os fatores que afetam a acumulação de glicosídeos em folhas de estévia, destacam-se, além do florescimento da cultura, a inter e intra variação de cultivares, temperatura, disponibilidade de nutrientes e radiação (BONDAREV *et al.*, 2003).

Maiores produções de biomassa em culturas estão diretamente relacionadas com o índice de área foliar maior, que aumenta a área de interceptação de radiação fotossinteticamente ativa. Uma maior interceptação não apenas influencia no crescimento da cultura, mas também aumenta o total de assimilados disponíveis para distribuição nas folhas (KUMAR *et al.*, 2014a). Nesse sentido, a densidade de



plantio parece exercer função tanto na produção de biomassa total quanto na acumulação de glicosídeos diterpênicos pela influência na radiação incidente.

Serfaty *et al.* (2013), em experimento realizado em Israel, registraram maiores produções de biomassa e esteviosídeo no plantio com maior densidade avaliada (10 plantas m<sup>-2</sup>), como nenhuma densidade de plantio maior que essa foi testada, os autores recomendam maiores estudos para avaliar plantios mais adensados.

Madan *et al.* (2010), em experimento realizado na Índia, registraram aumento na produtividade de folhas de estêvia com densidades de plantio entre 83.000 a 110.000 plantas ha<sup>-1</sup>, no primeiro ano de produção.

Espaçamento de 60 x 45 cm apresentou 43, 6% mais folhas e 117,5 % maior massa seca de folhas por planta em comparação com espaçamento de 30 x 30 cm, todavia com menores produções totais por unidade de área, conforme trabalho de Kumar *et al.* (2014 a). Os autores atribuíram a maior produtividade ao maior número de plantas ter compensado a vantagem individual do plantio menos adensado. Conforme análise de regressão realizada, sugere-se que plantios ainda mais adensados que os avaliados naquele experimento podem ainda gerar resposta em rendimento da cultura.

Segundo Holliday (1960), o pleno potencial produtivo de uma planta individual é alcançado quando ocorre o plantio em menores densidades, enquanto que a máxima produção por área é obtida quando as plantas individuais são submetidas à severa competição. Dados reportados por Ramesh *et al.* (2007) em plantio de estêvia em consórcio com outras espécies e por Kumar *et al.* (2014a; 2014b) ao avaliar diferentes densidades de plantio, confirmam as tendências de maior produtividades em plantios mais adensados.

Devido à baixa germinação observada em sementes de *Stevia rebaudiana*, bem como à variabilidade apresentada pela propagação sexuada, especialmente no que se refere ao teor de glicosídeos diterpênicos, a propagação da espécie a nível comercial se dá preferencialmente por estaquia e/ou micropropagação (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

Existem cerca de 90 cultivares de estêvia desenvolvidas atualmente, com diferentes características e exigências climáticas (MISHRA *et al.*, 2010; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). Programas de melhoramento da cultura tem objetivado a maior produção total de glicosídeos, mas principalmente aumentar a relação

rebaudiosídeo A/esteviosídeo nas folhas, o que caracteriza um produto de maior valor comercial (YADAV *et al.*, 2011).

Segundo Lemus-Mondaca *et al.* (2012), a estévia pode ser cultivada como cultura perene em regiões de clima tropical ou como cultura anual de verão em regiões de clima temperado, desde que apresentem verões quentes e chuvosos. No caso de utilizada como cultivo perene, as plantas podem ser usadas comercialmente por até 8 anos (MISHRA *et al.*, 2010).

Danos causados por insetos praga normalmente não são registrados na cultura, exceto algumas espécies de lagartas. Doenças fúngicas, causadas especialmente por *Septoria sp.* podem causar danos consideráveis em lavouras de estévia (MISHRA *et al.*, 2010).

A cultura apresenta baixa exigência de nutrientes, todavia grande sensibilidade ao déficit hídrico, requerendo frequentes irrigações superficiais, pelo menos uma vez por semana em condições de déficit (SHOCK, 1982; KAUSHIK *et al.*, 2010).

A poda do ápice em estévia é uma prática agrônômica que induz aumento no número de brotações devido à diminuição da dominância apical. Uma vez que as folhas são a parte economicamente importante da cultura, a poda do ápice pode levar à uma maior produção por área (PAL *et al.*, 2013).

Segundo Brandle e Rosa (1992) o principal fator que afeta o teor de glicosídeos diterpênicos é o florescimento, que é induzido pelo comprimento do dia e temperatura. Os teores das substâncias edulcorantes em estévia tendem a aumentar até o início do florescimento, diminuindo continuamente até a produção de sementes, sendo aconselhável, portanto, a colheita das folhas no início da abertura das flores (KANG e LEE, 1981; LIMA-FILHO *et al.*, 2004).

Segundo Mishra *et al.* (2010) a colheita de estévia pode ser realizada quando a cultura apresentar de 40 a 60 cm de altura, todavia destacando que maiores teores de glicosídeos se encontram em dias curtos, que induzem início do florescimento. Na avaliação de diferentes períodos de colheita (60 cm de altura, a cada dois meses e no início do florescimento), maiores produções de biomassa e teores de compostos de interesse foram registrados no início do florescimento (SERFATY *et al.*, 2013).

Variação sazonal no período de colheita também é responsável por alteração no teor de glicosídeos de esteviol, conforme o apontado em experimento realizado

no Egito por Nassar *et al.* (2001) que concluiu que a produção total de esteviosídeo é maior em colheitas de verão do que em colheitas de inverno.

O regime de colheita também altera a produção na cultura de estévia. Moraes *et al.* (2013) avaliaram três regimes de colheita no estado do Mississippi (EUA), e concluíram que produção de folhas, Rebaudiosídeo A e Esteviosídeo foram maiores para uma única colheita anual 180 dias após o plantio em comparação com duas colheitas com intervalo de 90 dias e três colheitas com intervalo de 60 dias. Em experimento semelhante realizado na Itália, maiores produções foram alcançadas realizando-se 2 colheitas por ano (ANDOLFI *et al.*, 2006). Pal *et al.* (2015) relataram que o cultivo de estévia perene com dois cortes anuais é o mais adequado para sustentar a produção na condição sub-temperada do Himalaia Ocidental na Índia.

Outros fatores agronômicos, conforme relatado por Ramesh *et al.* (2006), também se mostraram importantes na produção de estévia como a densidade de plantio e a altura da planta no momento da colheita, sugerindo a necessidade de maiores estudos para definir técnicas e períodos de colheita mais adequados, bem como necessidade de avaliação de adaptação local.

Mishra *et al.* (2010) afirmam que a secagem de estévia deve se dar imediatamente após a colheita, em estufa de secagem, e que o processo leva em média 22-48 horas à temperatura de 40 a 50°C. Periche *et al.* (2015) determinaram que a secagem a 180°C por 3 minutos é o método mais adequado para rendimento de antioxidantes, enquanto que para rendimento de esteviosídeo o procedimento deve ser a 100°C por 3 min ou secagem a sombra em temperatura ambiente.

Um hectare da cultura pode produzir entre 1000 e 1200 kg de folhas secas, contendo cerca de 60-70 kg de esteviosídeo, que, levando em conta ser 300 vezes mais doce que sacarose é equivalente a uma produção de 21.000kg desse açúcar por hectare (SERIO, 2010).

No Brasil, a maior empresa produtora, Steviafarma, alcançou duzentos hectares de área plantada no estado do Paraná no ano de 2011, estimando um preço de venda do cristal de estévia de R\$65,00 a R\$330,00 por quilo (CAETANO, 2011).

Os adoçantes extraídos de estévia estão comercialmente disponíveis no Japão, Coreia, China, sudeste da Ásia e América do Sul, onde vem sendo usados há décadas para adoçar diversos produtos alimentícios. Nos Estados Unidos da América, desde dezembro de 2008, quando a FDA (Food and Drug Administration)

autorizou o uso de extrato purificado de rebaudiosídeo A, o produto vem sendo utilizado como adoçantes em algumas bebidas e produtos alimentícios. Anteriormente os extratos de estévia eram permitidos no país apenas como suplemento dietético e produtos para a pele (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). Na França em 2009 o uso do extrato purificado de Rebaudiosídeo A (97%) também foi liberado e em 2010 a comercialização da estévia foi liberada pela União Europeia (EFSA, 2010).

Em 2014 Estados Unidos e Japão eram os principais consumidores de estévia, chegando juntos à uma parcela de 60% do consumo mundial. Como principal produtor encontrava-se a China com 80% da produção global (ANKIT, 2014).

### 3 EFEITO DE DENSIDADES DE PLANTIO E ÉPOCAS DE COLHEITA EM ASPECTOS FISIOLÓGICOS E PRODUTIVOS DE *Stevia rebaudiana* BERTONI

#### RESUMO

*Stevia rebaudiana* Bertoni é uma espécie caracterizada pela produção de substâncias com elevado potencial edulcorante e desprovidas de valor calórico. Dentre estas substâncias, o rebaudiosídeo A e o esteviosídeo são as produzidas em maior quantidade. Densidade de plantio e época de colheita são fatores que possuem influência decisiva na produção de biomassa e compostos edulcorantes. Neste sentido, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito de diferentes densidades de plantio e épocas de colheita nas características fisiológicas e produtivas de um aceso de estevia sob condições de clima temperado úmido. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema de parcelas subdivididas, com 9 tratamentos avaliando o efeito de três densidades de plantio (166.667; 83.333; e 33.333 plantas ha<sup>-1</sup>) nas parcelas e três épocas de colheita (antes, no início e a pleno florescimento) nas subparcelas. A colheita realizada no início do florescimento promoveu maior produtividade de biomassa seca de folhas e, associada com a menor densidade de plantio, maiores teores rebaudiosídeo A e esteviosídeo. A menor densidade de plantio resultou em maior acúmulo de biomassa de folhas, todavia, o número de plantas na densidade mais elevada compensou a menor produção por unidade, promovendo maiores produtividades. A interação entre a densidade de 166.667 plantas ha<sup>-1</sup> e a colheita no início do florescimento promoveu maiores produtividades de rebaudiosídeo A (43,22 kg ha<sup>-1</sup>), bem como maior relação rebaudiosídeo A/ esteviosídeo (0,60). Este comportamento se justifica em função remobilização de moléculas como proteínas e carboidratos no decorrer do florescimento, e da maior produção de biomassa de folhas nestas condições.

**Palavras-chave:** Estévia, esteviosídeo, fotossíntese, rebaudiosídeo A.

## EFFECT OF PLANT DENSITIES AND HARVESTING TIMES ON PHYSIOLOGICAL AND PRODUCTIVE ASPECTS OF *Stevia rebaudiana* BERTONI

### ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* Bertoni is species characterized by to the production of substances with high sweetening potential and without caloric value. Among these substances, rebaudioside A and stevioside are those produced in greater quantity. Plant density and harvesting time are factors that have a decisive influence on the production of biomass and sweetening compounds. Thus, the objective of this research was to evaluate the effect of different planting densities and harvesting times on the productive, physiological and biochemical characteristics of a stevia accession under temperate/humid climate conditions. The experimental design was in randomized blocks, in a split-plot scheme, with 9 treatments evaluating the effect of three planting densities (166,667, 83,333 and 33,333 plants ha<sup>-1</sup>) in the plots and three harvesting periods (before, in the onset and in full flowering) in the subplots. Harvesting at the onset of flowering promoted higher productivity of dry leaf biomass and, when associated with the lowest planting density, promoted higher levels of rebaudioside A and stevioside. The lower planting density resulted in greater leaves biomass accumulation per plant, whereas, the number of plants at the highest density compensated for the lower production per unit, promoting higher yields. The interaction between the density of 166,667 plants ha<sup>-1</sup> and the harvest at the onset of flowering promoted higher yields of rebaudioside A (43.22 kg ha<sup>-1</sup>) as well as higher rebaudioside A/ stevioside ratio (0.60). This behavior is justified by the remobilization of molecules such as proteins and carbohydrates during flowering and And higher biomass of leaves under these conditions.

**Key words:** Photosynthesis, rebaudioside A, stevia, stevioside.

### 3.1 INTRODUÇÃO

*Stevia rebaudiana* Bertoni, popularmente conhecida como estévia, capim doce ou honeyleaf, é um arbusto herbáceo pertencente à família Asteraceae, nativo do nordeste do Paraguai, com ocorrência natural também nas regiões vizinhas pertencentes ao território brasileiro e argentino (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). Embora rara no seu habitat natural, o cultivo comercial de estévia especialmente na América do Sul e Ásia, bem como uso ornamental na Europa e América do Norte tem feito a ocorrência da espécie no mundo mais comum do que jamais fora (BRANDLE e TELMER, 2007).

A planta está se tornando cada vez mais importante como cultivo agrícola pela produção de metabólitos secundários denominados glicosídeos diterpênicos ou glicosídeos de esteviol, com alto potencial edulcorante e sem valor calórico. Destes glicosídeos, os de valor comercial mais elevado são o esteviosídeo e rebaudiosídeo A, por volta de 300 e 400 vezes mais doces que a sacarose, respectivamente (MANDAL *et al.*, 2013; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012;).

A nível global estimava-se uma movimentação de até 11 bilhões de dólares em 2015 em produtos de estévia (ANKIT, 2014). Considerando o contexto brasileiro, a produção não é suficiente para suprir a demanda interna, sendo registrada uma importação de mais de 6 milhões de dólares só em esteviosídeo no ano de 2015 (BRASIL, 2016).

Considerando o potencial econômico da cultura especialmente em território nacional, fazem-se necessários estudos no sentido de definir as práticas de manejo mais adequadas para promover maiores produções de biomassa e teores de compostos de interesse. Dentre as diversas práticas de manejo para a cultura, a densidade de plantio e a época de colheita parecem ter influência decisiva na produção tanto de biomassa quanto de glicosídeos diterpênicos.

O principal fator que afeta o teor de glicosídeos diterpênicos em estévia é o florescimento (BRANDLE e ROSA, 1992). Também de extrema importância é a radiação, marcadamente afetada por densidades de plantio, que pode ser determinante na produção de biomassa e compostos edulcorantes (SERFATY *et al.* 2013).

A maior eficiência na conversão de assimilados para produção de biomassa na espécie se dá no início do florescimento (LIMA-FILHO, 2004), fase em que

também se verificam maiores teores de esteviosídeo e rabaudiosídeo A em função da maior expressão de genes envolvidos na rota biossintética destes compostos (YANG *et al.*, 2015).

Quanto a influência de espaçamentos, densidades de plantio entre 83.000 e 111.000 plantas ha<sup>-1</sup> são recomendadas para maiores produtividades de biomassa e compostos edulcorantes (MADAN *et al.*, 2010; SERFATY *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2014a), alguns autores relatam, no entanto, que plantios mais adensados podem ainda proporcionar aumentos de biomassa por área (KUMAR *et al.*, 2014a).

Nesse sentido, o objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito de diferentes densidades de plantio e épocas de colheita nas características produtivas e fitoquímicas de um genótipo de estévia em região de clima temperado úmido.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.1 Implantação, condições edafoclimáticas e condução do experimento

O experimento foi conduzido em condições de campo no Centro de Estações Experimentais do Cangüiri (CEEx), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), município de Pinhais, Paraná, Brasil. A estação está localizada a 25°23'12.3"S latitude, 49°07'33.2"W de longitude e 920m de altitude.

O clima da região é temperado úmido com verão temperado, sendo classificado como Cfb no sistema de classificação climática de Köppen (KÖPPEN, 1931). No decorrer do experimento a temperatura máxima registrada foi de 32,3°C e a mínima de 11,6°C. Os dados climáticos sob os quais o experimento foi conduzido são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Condições climáticas durante o experimento. Pinhais/PR, 2015/2016.

Variáveis	Mês/Ano			
	NOV/2015	DEZ/2015	JAN/2016	FEV/2016
Precipitação (mm)	112,70	200,40	164,20	289,30
Umidade Relativa do ar (%)	90,98	88,57	86,35	89,46
Média das Temperaturas máximas (°C)	24,47	26,46	26,06	27,78
Média das Temperaturas mínimas (°C)	15,61	17,48	16,67	18,16
Temperatura média (°C)	18,81	20,91	20,42	21,55

Fonte: Sistema meteorológico do Paraná (SIMEPAR), 2016.



Para preparo do solo, realizou-se aração a 20 cm de profundidade seguida de gradagem superficial. Amostras de solo foram coletadas na profundidade de 20 cm e encaminhadas para análise química e granulométrica, cujos resultados são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Características químicas e granulométricas do solo utilizado no experimento. Pinhais, 2015/2016.

Granulometria											
Argila		Silte		Areia total			Areia grossa		Areia fina		
----- g kg <sup>-1</sup> -----											
513		175		313			141		172		
Características químicas											
pH		Al <sup>+3</sup>	H <sup>+</sup> +Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	SB	T	P	C	V
CaCl <sub>2</sub>	SMP	----- cmol/dm <sup>3</sup> -----						mg/dm <sup>3</sup>		g/dm <sup>3</sup>	%
6,0	6,3	0,0	4,00	6,50	2,90	0,65	10,05	14,05	46,20	28,9	72

Conforme interpretação da análise de solo e recomendação do Manual de adubação e calagem para os estados do Rio grande do Sul e Santa Catarina para o cultivo de estévia (CQFS-RS/SC, 2004), realizou-se a aplicação de 60 kg de nitrogênio por hectare. A aplicação foi realizada a lanço, utilizando ureia (45% de N) como fonte de nitrogênio. Ainda conforme recomendação do manual de adubação e calagem, a aplicação foi parcelada, sendo a primeira parcela de 1/3 do nitrogênio na ocasião do plantio e o restante após 20 dias.

A implantação do experimento foi realizada no dia 07 de novembro de 2015, com mudas de aproximadamente 15 a 20 cm de altura em espaçamentos variáveis conforme tratamentos. Após 15 dias da instalação foi realizado o replantio, com o objetivo de manter as densidades de plantio sem variações. Foi observado um índice de 8% de mortalidade.

Durante todo o período de condução do experimento foram realizadas capinas semanais para controle das plantas daninhas. Não foram necessários procedimentos fitossanitários para controle de pragas e doenças. Considerando volume pluviométrico suficiente, também não foi necessária irrigação.

### 3.2.2 Material vegetal e produção de mudas

Um total de sete acessos de *S. rebaudiana*, identificados pelas numerações 4, 6, 7, 8, 9, 12 e 14 foram fornecidos pela EMBRAPA CENARGEN Brasília e avaliadas por Francisco (2015) quanto ao desempenho produtivo nas condições edafoclimáticas da região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná. Dos sete acessos, três, acessos 6, 7 e 14, foram identificados com padrões de relação de rebaudiosídeo A e esteviosídeo próximos a 1, desejável para a indústria. O acesso de número 6, selecionado para utilização no presente trabalho apresentou produção de massa seca de folhas de 4008,3 kg ha<sup>-1</sup>, em duas colheitas, com relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo 0,95, e produção de 9,7% de rebaudiosídeo A na média das duas colheitas (FRANCISCO, 2015).

O material, foi multiplicado por meio de micropropagação no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Quando em número suficiente, segmentos caulinares com dois pares de folhas das plantas micropropagadas foram plantados em tubetes de 120 cm<sup>3</sup> preenchidos com substrato comercial Tropstrato<sup>®</sup>. Os tubetes foram dispostos em suportes plásticos e permaneceram por 15 dias para aclimação em casa de vegetação com nebulização intermitente de 5 segundos a cada 30 minutos. Após este período foram transferidas para casa de vegetação sem nebulização com rega manual diária por um período de 30 dias. Ao final do período, foram selecionadas as mudas com 15 a 20 cm de altura e cinco pares de folhas.

### 3.2.3 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema de parcelas subdivididas, com 9 tratamentos avaliando o efeito de três densidades de plantio (166.667; 83.333; e 33.333 plantas ha<sup>-1</sup>) nas parcelas e três épocas de colheita (antes, no início e a pleno florescimento) nas subparcelas, com 4 repetições. Cada parcela possuía 65 plantas, sendo nove plantas uteis em cada subparcela. O tamanho das parcelas foi variável em função das diferentes densidades. Utilizou-se uma linha de plantas como bordadura.

As densidades de plantio foram calculadas em função de diferentes espaçamentos, sendo 0,60 x 0,50 m; 0,40 x 0,30 m; e 0,30 x 0,20 m. As épocas de colheita foram realizadas conforme observação da fenologia das plantas. A colheita antes do florescimento se deu com 75 dias após o transplante, quando menos da

metade das plantas apresentavam formação do botão floral, e sem nenhuma flor aberta. A colheita no início do florescimento foi realizada quando as plantas apresentavam cerca de 5% de capítulos com a presença de flores abertas, o que ocorreu aos 96 dias após o transplântio. E, por fim, a colheita em florescimento pleno se deu quando mais de 50% das plantas apresentavam a maioria dos capítulos com flores abertas, no 110º dias após o transplântio.

#### 3.2.4 Avaliações biométricas e cálculo dos índices fisiológicos

As plantas foram colhidas com corte a 5 cm do solo. A altura da base até o ápice da planta foi medida com régua graduada e o número de ramificações do (s) ramos (s) principais foi contado. Após este procedimento as folhas foram separadas do caule e flores manualmente, pesadas para determinação de massa fresca de folhas e caules, e, em seguida, armazenadas em sacos de papel multifoliado Kraft®. Os caules e folhas permaneceram em secador com circulação de ar forçado a 65 °C até peso constante e foram novamente pesados para determinação da massa seca de folhas e massa seca total da parte aérea.

Foram pesados 60 discos de folhas de 0,785 cm<sup>2</sup> de cada subparcela experimental para aferição da área foliar (AF) calculada proporcionalmente ao peso total de folhas da parcela. Com base na área foliar e pesagens foram realizados os cálculos de índice de área foliar (IAF), área foliar específica (AFE), razão de área foliar (RAF) e razão de peso foliar (RPF).

O IAF foi determinado através da razão entre os valores da área foliar e área de solo (AS) ocupada pelas plantas obtidos em cada subparcela:  $IAF = AF/AS$ . A RAF foi calculada pela razão entre os valores da área foliar total e massa seca total:  $RAF = AF/MST$ . AFE foi calculada através da razão entre a área foliar e a massa seca das folhas:  $AFE = AF/MSF$ . RPF foi calculada pela razão entre a massa seca de folhas e a massa seca total:  $RPF = MSF/MST$ .

#### 3.2.5 Determinação dos teores de clorofilas a, b e total

Foram retirados e pesados 20 discos de 0,785 cm<sup>2</sup> de tecido vegetal do terço médio das folhas. Posteriormente, o material foi macerado em almofariz com 10 ml de acetona 80% e colocado em tubos de ensaio revestidos com papel-alumínio. Os recipientes foram submetidos à centrifugação durante 10 minutos, a 12.000 rpm com

refrigeração a 4°C. 1 ml do sobrenadante foi transferido para cubetas e submetido à leituras em espectrofotômetro modelo UV-1601-Shimadzu nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm, utilizando-se acetona a 80% como controle. Para quantificação das clorofilas a, b, e total ( $\text{mg cm}^{-2}$ ), foram utilizadas as seguintes equações:

$$\text{Clorofila a (mg/cm}^2\text{)} = \{(0,0127 \times \text{abs663} - 0,00269 \times \text{abs645})\} \times V \times 10/S$$

$$\text{Clorofila b (mg/cm}^2\text{)} = \{(0,0229 \times \text{abs645} - 0,00468 \times \text{abs663})\} \times V \times 10/S$$

$$\text{Clorofila total (mg/cm}^2\text{)} = \{(0,0202 \times \text{abs 645} + 0,00802 \times \text{abs663})\} \times V \times 10/S$$

Sendo: *abs645* e *abs663* = Absorbância a 645 e 663 nm respectivamente.

V= Volume final do extrato (ml).

S= Área total dos discos foliares

### 3.2.6 Determinação dos teores de proteínas totais

Para quantificação do conteúdo de proteínas totais nas amostras empregou-se o método descrito por BRADFORD (1976). Um total de 0,5 g do tecido foliar fresco de cada amostra foi macerado em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5) e filtrado. Uma alíquota de 0,05 mL do material filtrado foi colocada em tubo de ensaio juntamente com 0,45 mL de água destilada e 1,0 mL do reagente Bio-Rad®. O material foi transferido para cubetas de quartzo e submetido à leitura em espectrofotômetro, modelo UV-1601-Shimadzu à 630 nm, com soro albumina bovina como padrão.

### 3.2.7 Determinação dos teores de Açúcares totais

Os teores de açúcares solúveis totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico, descrito por DUBOIS *et al.* (1956). 0,1 g do tecido foliar fresco foi macerada em almofariz contendo 10 mL de tampão fosfato 0,2M (pH 7,5) e filtrada. 0,01 mL do material filtrado foi colocado em tubo de ensaio com 0,049 mL de água destilada. À esta solução adicionou-se 0,5 mL de Fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após o resfriamento em temperatura ambiente o material foi transferido para cubetas de quartzo e submetido à leitura em espectrofotômetro, modelo UV-1601-Shimadzu à 490 nm. A concentração de açúcares totais foi determinada através de curva padrão de glicose.

### 3.2.8 Determinação dos teores de rebaudiosídeo A e esteviosídeo

As análises dos teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram realizadas de acordo com a metodologia adaptada de Kolb *et al.* (2001). Para a extração dos glicosídeos diterpênicos 0,5 g de tecido foliar seco foi triturado e transferido para recipientes contendo 50 mL de etanol 70%. A solução foi submetida a agitação constante por 30 minutos em banho maria a 70°C. O material foi filtrado em filtros de seringa de 0,2 µm e transferido para tubos tipo Eppendorf, onde ficou armazenado em freezer (-18°C) por dois dias até a quantificação.

A determinação dos teores dos glicosídeos de esteviol foi realizada por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) por meio de curva de calibração criada por diluição de padrão analítico de esteviosídeo e rebaudiosídeo A da marca comercial Sigma®. Foram determinados teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, relação entre rebaudiosídeo A e esteviosídeo (R/E), e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A.

### 3.2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste Bartlett para verificação da homogeneidade de variâncias e, quando, homogêneas, realizou-se análise de variância ANOVA e teste de separação de médias Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se o programa estatístico ASSISTAT® (SILVA e AZEVEDO, 2016).

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Variáveis biométricas e índices fisiológicos

Para as variáveis altura, número de ramificações, índice de área foliar, área foliar específica, razão de peso foliar e razão de área foliar não houve interação entre as densidades de plantio e época de colheita. Avaliando os fatores isoladamente, a densidade de plantio foi significativa apenas para o índice de área foliar, enquanto que a época de colheita não apresentou significância apenas para a razão de peso foliar (Anexo 1).

A altura de plantas (Tabela 3) atingiu valores máximos na colheita realizada em pleno florescimento, com incremento médio de mais de 15 centímetros comparando-se com a colheita anterior ao florescimento, fato relacionado ao maior

tempo de desenvolvimento da cultura. Para esta variável não houve influência das densidades de plantio. Kumar *et al.* (2014b), de maneira semelhante, não observaram variações significativas na altura de plantas cultivadas em diferentes densidades, destacando, contudo, alterações no número de ramificações por planta o que contrasta com o presente trabalho, onde esta variável foi influenciada apenas pela época de colheita.

O número de ramificações foi significativamente menor na colheita realizada antes do florescimento. O aumento no número de ramificações nas colheitas em pleno florescimento e início do florescimento pode ser atribuído ao maior tempo para o desenvolvimento radicial. Uma vez que a síntese de citocininas ocorre principalmente nos ápices radiculares/radiciais, um sistema radicial mais desenvolvido permite maior produção destes fitohormônios e sua exportação para os caules, onde estimulam a produção de ramos laterais (PAL *et al.*, 2015).

Em trabalho realizado com o objetivo de avaliar diferentes regimes de colheita para o cultivo de estêvia, Pal *et al.* (2015) também verificaram influência do ciclo de vida da planta no número de ramificações e apontaram uma correlação desta variável com o índice de área foliar, promovida pela ação de citocininas no atraso da senescência. Comportamento semelhante foi observado no presente trabalho, com incremento médio de mais de 100% no IAF da colheita anterior ao florescimento em relação à colheita no início do florescimento, fato atribuído ao maior desenvolvimento vegetativo no segundo período de colheita.

O índice de área foliar (IAF), definido por Watson (1947) como a área total unilateral de tecido foliar por unidade de área de superfície do solo, é uma quantidade adimensional que caracteriza o dossel de uma cultura. Qualquer alteração no índice de área foliar do dossel (por geada, tempestade, desfolha, seca ou práticas de manejo) é acompanhada por modificações na produtividade do povoamento (BRÉDA, 2003).

Apesar da diferença observada no decorrer do ciclo da cultura em relação às épocas de colheita, o espaçamento foi o fator que apresentou maior influência nesta variável (Tabela 3), uma vez que em culturas comerciais a área do solo disponível é corresponde ao espaçamento estabelecido (LIMA-FILHO *et al.*, 2004).

Maiores índices (média de 1,45) foram observados no plantio mais adensado e os menores valores na densidade de 33.333 plantas ha<sup>-1</sup> (0,59), apresentando, aumento diretamente proporcional ao aumento da população, fato também

observado por em cultivo de *S. rebaudiana* na Colômbia (JARMA *et al.*, 2010) e no Himalaia (KUMAR *et al.*, 2014b) .

**TABELA 3.** Médias de altura, número de ramificações, índice de área foliar , área foliar específica razão de peso foliar e razão de área foliar em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita (Pinhais/PR (2016)).

Densidades de plantio	Variação	166.667 plantas ha <sup>-1</sup>	83.333 plantas ha <sup>-1</sup>	33.333 plantas ha <sup>-1</sup>
	Altura (cm)	54,05 <sup>ns</sup>	57,97	55,79
	Número de ramificações (n)	14,66 <sup>ns</sup>	18,77	18,28
	Índice de área foliar	1,45 a	1,05 b	0,59 c
	Área foliar específica (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	24,75 <sup>ns</sup>	19,61	24,71
	Razão de peso foliar (g g <sup>-1</sup> )	0,50 <sup>ns</sup>	0,51	0,55
	Razão de área foliar (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	13,71 <sup>ns</sup>	11,18	14,54
	Variação	Antes do florescimento	Início do florescimento	Pleno florescimento
Épocas de Colheita	Altura (cm)	44,54 b	61,41 a	61,85 a
	Número de ramificações (n)	9,74 b	20,96 a	21,05 b
	Índice de área foliar	0,62 b	1,32 a	1,15 a
	Área foliar específica (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	14,63 b	28,61 a	25,82 a
	Razão de peso foliar (g g <sup>-1</sup> )	0,56 <sup>ns</sup>	0,48	0,51
	Razão de área foliar (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	8,33 b	16,40 a	14,70 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). <sup>ns</sup>: não significativo.

É importante considerar, no entanto, que a interceptação da radiação solar garante taxas máximas de crescimento da cultura quando o IAF aumenta até um valor crítico. A partir deste ponto novas áreas foliares não resultam em aumento da quantidade de luz interceptada, uma vez que a competição excessiva pode provocar reduções na taxa média fotossintética por unidade área foliar (SCHWERZ *et al.*, 2016). Faz-se, portanto necessário, a observação da dinâmica da interceptação de luz na produção de biomassa por planta e por hectare visando o estabelecimento de um IAF ótimo para a cultura.

Observando valores de referência para *S. rebaudiana*, Kumar *et al.* (2014b) relatam IAF máximo de 1,21 em espaçamento de 30 x 30 cm e mínimo de 0,48 em espaçamento 0,45 x 0,30 cm, valores semelhantes ao presente trabalho. Lima-Filho (2004) em análise do crescimento da cultura reportou IAF de 0,35, considerado muito baixo. JARMA *et al.* (2010) registraram valor máximo de 3,15, segundo os autores, ainda muito distante do IAF crítico estimado para a cultura com base na avaliação da fração da radiação fotossinteticamente ativa interceptada pelo dossel. Estas variações denotam a importância da utilização de outros indicadores para a

compreensão do desenvolvimento vegetativo da planta, dentre eles a área foliar específica.

A área foliar específica (AFE) expressa a razão entre área foliar e massa seca da folha. É considerado um índice importante do ponto de vista fisiológico por representar a alocação da biomassa da folha por unidade de área (POORTER e GARNIER, 1999).

No presente trabalho apenas o fator época de colheita apresentou-se significativo para esta variável, mostrando aumento nas colheitas de início e pleno florescimento em relação à colheita anterior ao florescimento (Tabela 3). Este fato é atribuído ao maior desenvolvimento da cultura e expansão da área foliar que promove maior sombreamento, e conseqüentemente, níveis mais baixos de radiação incidente ao longo do dossel. Em condições de baixa radiação, as plantas investem relativamente maior proporção de fotoassimilados e outros recursos no aumento da área foliar, apresentando aumento na AFE e folhas com menor densidade de massa. Geralmente estas alterações têm por objetivo aumentar a captação da luz incidente, aumentando a eficiência fotossintética da planta (LAMBERS *et al.*, 2008).

Outro índice fisiológico importante é a razão de peso foliar (RPF). A RPF expressa a fração de massa seca não exportada das folhas para o resto da planta. A taxa de exportação de fotoassimilados da folha é uma característica genética, porém sob forte influência de variáveis ambientais (BENINCASA, 2003). Para a cultura da estévia este índice representa também o índice de colheita, uma vez que, via de regra, apenas as folhas possuem interesse comercial. Os valores observados no presente trabalho variaram de 0,47 a 0,59, não sendo significativamente influenciados pelas condições de cultivo.

A Razão de área foliar (RAF) também é uma variável importante para compreender o crescimento e a utilização da radiação em cultivos agrícolas. Determinada através da razão entre os valores da área foliar total e massa seca total, a RAF é a medida da dimensão do aparelho assimilador, servindo como indicador para avaliações de efeitos genotípicos, climáticos e de manejo em comunidades vegetais. Este índice representa a área foliar útil para a fotossíntese. É um componente morfofisiológico, pois é a razão entre a área foliar (área responsável pela captação de luz e absorção de CO<sub>2</sub>) e a massa seca total (resultado da fotossíntese líquida), ou seja, a RAF é a área foliar usada para produzir 1g de massa seca (MAGALHÃES, 1979; BENINCASA, 2003).



No presente trabalho a colheita anterior ao florescimento apresentou menores valores de RAF. As colheitas no início e pleno florescimento não diferiram estatisticamente, apesar de ter sido observado leve decréscimo na última (Tabela 3). Estes dados diferem do reportado por Lima-Filho (2004) que registrou decréscimo na RAF em estévia ao longo do desenvolvimento, tendo se estabilizado em um patamar mínimo a partir dos 60 dias após o transplântio.

Os resultados obtidos no presente estudo podem ser explicados pelo maior desenvolvimento e número de ramificações nas colheitas no início e pleno florescimento. Possivelmente, o maior sombreamento decorrente deste desenvolvimento promoveu um investimento maior no tecido da folha para conseguir uma maior captação de luz, como foi observado para a AFE, uma vez que RPF manteve-se constante. Comportamento semelhante foi relatado por Jarma *et al.* (2006) para cultivo de estévia no Caribe colombiano, onde se observou incremento de RAF a medida que houve diminuição da radiação incidente.

A discussão dos índices fisiológicos é importante para compreender a dinâmica da produtividade e acúmulo de biomassa total e especialmente de folhas, assunto discutido nos tópicos seguintes.

### 3.3.2 Acúmulo e produtividade de biomassa

Não foi verificado efeito de interação para as variáveis massa seca de folhas por planta, massa seca de parte aérea por planta e produtividade de massa seca de folhas, apenas houve interação para a massa seca de parte aérea total. Avaliando os fatores isoladamente, tanto as épocas de colheita quanto as densidades de plantio foram significativos para todas estas variáveis (Anexo 2).

Para época de colheita, todas as variáveis de biomassa apresentaram comportamento semelhante, com superioridade nas colheitas de início e pleno florescimento (Tabela 4). Este comportamento se justifica pelo maior desenvolvimento vegetativo das plantas nestas fases em relação à colheita anterior ao florescimento. Lima-Filho (2004) ao realizar análise de crescimento da cultura também relatou maiores valores de biomassa nas épocas de início e pleno florescimento. O autor, todavia, ressalta que houve maior eficiência na conversão de assimilados à produção econômica (folhas) no início do florescimento, época recomendada para a colheita não apenas pela produção de biomassa, mas também pela maior concentração de glicosídeos diterpênicos.

**TABELA 4.** Médias de massa seca de folhas e massa seca de parte aérea por planta e produtividade de massa seca de folhas em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita. Pinhais/PR (2016).

Densidades de plantio	Variação	166.667 plantas ha <sup>-1</sup>	83.333 plantas ha <sup>-1</sup>	33.333 plantas ha <sup>-1</sup>
	Massa seca de folhas por planta (g)	6,32 b	10,65 ab	14,30 a
	Massa seca de parte aérea por planta (g)	12,69 b	21,22 ab	26,31 a
	Massa seca de folhas por hectare (kg)	1053,67 a	887,40 ab	476,83 b
Épocas de Colheita	Variação	Antes do florescimento	Início do florescimento	Pleno florescimento
	Massa seca de folhas por planta (g)	5,46 b	11,63 a	14,18 a
	Massa seca de parte aérea por planta (g)	9,69 b	24,07 a	26,31 a
	Massa seca de folhas por hectare (kg)	433,40 b	943,82 a	1040,67 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>ns</sup>: não significativo.

Em cultivo de estêvia em Israel, a interação entre densidades de plantio (60.000; 80.000 e 100.000 plantas ha<sup>-1</sup>) e três indicadores de colheita (a cada dois meses, com 60 cm de altura e no início de florescimento) demonstraram que o florescimento é realmente o parâmetro mais adequado para indicar o período de colheita da espécie. Os melhores resultados para biomassa seca de folhas foram obtidos no início do florescimento para as três densidades (2200; 2600 e 3000 kg ha<sup>-1</sup>), ocasião na qual as folhas contribuíram com mais de 50% do total da biomassa seca (SERFATY *et al.*, 2013). No presente trabalho, apesar de produções de biomassa mais baixas do que as relatadas pelos autores, em todos os períodos de colheita a proporção de folhas na biomassa total da planta manteve-se praticamente constante, representando cerca de 50% da biomassa da planta.

Com relação às densidades de plantio, Serfaty *et al.* (2013) relataram que um stand de 100.000 plantas ha<sup>-1</sup> resultou em maiores produtividades de biomassa de folhas, valores semelhantes aos recomendados por Donaliseo *et al.* (1982). Incrementos nos valores de biomassa também foram relatados por Madan *et al.* (2010) com densidades entre 83.000 e 111.000 plantas ha<sup>-1</sup>. Estes autores, todavia, não avaliaram densidades de plantio maiores, o que ressalta a necessidade de estudos mais detalhados neste aspecto, conforme realizado no presente trabalho.

A menor densidade de plantio (33.333 plantas ha<sup>-1</sup>) resultou no maior acúmulo de biomassa de folhas e biomassa total por planta, todavia o número de plantas na maior densidade (166.667 plantas ha<sup>-1</sup>) compensou a menor produção por unidade, promovendo maiores produtividades de massa seca de folhas (Tabela 4).

A maior produção de biomassa por planta na densidade de 33.333 plantas ha<sup>-1</sup> está associada à menor competição por a luz solar e recursos do solo, enquanto

que as produtividades superiores no plantio mais adensado são função do maior número de plantas na parcela, compensando as vantagens individuais (KUMAR *et al.* 2014 a). Segundo Holliday (1960), o pleno potencial produtivo de uma planta individual é alcançado quando ocorre o plantio em menores densidades, enquanto que a máxima produção por área é obtida quando as plantas individuais são submetidas à severa competição. Dados reportados por Ramesh *et al.* (2007) em plantio de estêvia em consórcio com outras espécies e por Kumar *et al.* (2014 ab) ao avaliarem diferentes densidades de plantio, confirmam as tendências de maior produtividades em plantios mais adensados.

Para a produtividade de massa seca de parte aérea, observando efeito de interação, percebe-se que na colheita anterior ao florescimento não houve efeito das densidades de plantio. No início do florescimento, as densidades de 166.667 e 83.333 plantas ha<sup>-1</sup> promoveram maiores acúmulos de biomassa por área. Na colheita em pleno florescimento, a densidade de 166.667 plantas ha<sup>-1</sup> foi superior as demais (tabela 5). Provavelmente o desenvolvimento maior a medida que houve progressão do florescimento potencializou o efeito da densidade mais elevada, culminando nas maiores produtividades.

**TABELA 5.** Médias de produtividade de massa seca de parte aérea em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita. Pinhais/PR (2016).

Massa seca de parte aérea por hectare (kg)				
	Densidades de plantio (plantas ha <sup>-1</sup> )			
Colheitas	166.667	83.333	33.333	Média
Antes do florescimento	1061,55 bA	870,80 bA	408,22 bA	780,19
Início do florescimento	1985,01 aA	2213,87 aA	984,24 abB	1737,63
Pleno florescimento	2596,49 aA	1549,52 aB	1223,51 aB	1789,84
Média	1881.01	1655.65	871.99	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A maior produção de biomassa por área em plantios mais adensados está associada ao aumento do índice de área foliar (Tabela 3), que aumenta a interceptação de radiação fotossinteticamente ativa, estimulando o crescimento da cultura e a produção de fotoassimilados para distribuição nas folhas (KUMAR *et al.*, 2014a). A relação entre maior produção de biomassa e radiação incidente em cultivo de *S. rebaudiana* foi reportada por Jumar *et al.* (2006), que demonstrou que a exposição a 100% de radiação aumenta a eficiência de produção de biomassa por centímetro quadrado de superfície foliar na espécie.

Apesar de ter havido incremento na produção de massa seca de folhas  $\text{ha}^{-1}$  na maior densidade de plantio (média de 1053,67  $\text{kg ha}^{-1}$ ), e de estarem próximos aos máximos relatados por Pal *et al.* (2015), Kumar *et al.* (2014b), Pal *et al.* (2013), González *et al.* (2007) e Mejegi *et al.*, (2005) para o primeiro corte em primeiro ano de cultivo, os valores de produtividade são inferiores aos máximos relatados por diversos autores (FRONZA e FOLEGATTI, 2003; LIMA FILHO *et al.*, 2004; ANDOLFI *et al.*, 2006; SERFATY *et al.*, 2013; MORAES *et al.*, 2013). Os valores de produtividade obtidos no presente trabalho são ainda inferiores aos relatados por Francisco (2015) para o mesmo material genético em condições de cultivo semelhantes, com plantio realizado em setembro de 2014, quando se reportou produtividade de massa seca de folhas de 3255,1  $\text{kg ha}^{-1}$ .

Esta redução de produtividade está associada à diminuição do período vegetativo ocasionado por diferenças na época de transplante, realizada em meados novembro no presente experimento. Verificou-se uma redução de 48 dias no período vegetativo comparando o mesmo acesso e época de colheita avaliados por Francisco (2015).

O plantio tardio (novembro) reduz o período de crescimento vegetativo, uma vez que, a partir do fim do mês dezembro ocorre diminuição constante do fotoperíodo, o que estimula o florescimento da cultura, que ocorre naturalmente entre janeiro e março no hemisfério sul (AHMED *et al.* 2011; YADAV *et al.*, 2011). Plantios realizados até meados de outubro são mais desejáveis, visando aumento na duração do período vegetativo, pois é quando se alcança o máximo da produção econômica (LIMA-FILHO, 2004; LIMA-FILHO *et al.*, 2004)

### 3.3.3 Variáveis bioquímicas

Para as variáveis bioquímicas não houve interação significativa entre os tratamentos. Avaliando os fatores isoladamente a densidade de plantio influenciou a produção de clorofila a e clorofila total, enquanto que a época de colheita foi significativa para os teores de proteínas e açúcares solúveis totais (Anexo 3).

Os teores de clorofila a e clorofila total foram significativamente superiores nas densidades de plantio de 33.333 e 88.333 plantas  $\text{ha}^{-1}$  (Tabela 6). A clorofila a é o principal pigmento utilizado na captação de elétrons para realização da etapa fotoquímica do processo fotossintético, enquanto que a clorofila b é considerada um pigmento acessório, uma vez que auxilia na absorção de luz (em comprimentos de

onda maiores) e na transferência de energia radiante para os centros de reação (STREIT *et al.*, 2005; TAIZ e ZIEGER, 2013).

**TABELA 6.** Médias de teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, relação clorofila *a/b*, proteínas, açúcares totais em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita (Pinhais/PR (2016)).

Densidades de plantio	Variação	166.667 plantas ha <sup>-1</sup>	83.333 plantas ha <sup>-1</sup>	33.333 plantas ha <sup>-1</sup>
	Clorofila <i>a</i> (mg cm <sup>-2</sup> )	0,065 b	0,080 a	0,078 a
	Clorofila <i>b</i> (mg cm <sup>-2</sup> )	0,035 <sup>ns</sup>	0,041	0,036
	Clorofila total (mg cm <sup>-2</sup> )	0,100 b	0,121 a	0,115 a
	Relação clorofila <i>a/b</i>	1,865 <sup>ns</sup>	1,933	2,241
	Proteínas (mg g <sup>-1</sup> )	49,03 <sup>ns</sup>	49,59	53,20
	Acúcares totais (mg g <sup>-1</sup> )	422,30 <sup>ns</sup>	382,47	467,62
Épocas de colheita	Variação	Antes do florescimento	Início do florescimento	Pleno florescimento
	Clorofila <i>a</i> (mg cm <sup>-2</sup> )	0,068 <sup>ns</sup>	0,074	0,081
	Clorofila <i>b</i> (mg cm <sup>-2</sup> )	0,036 <sup>ns</sup>	0,037	0,039
	Clorofila total (mg cm <sup>-2</sup> )	0,105 <sup>ns</sup>	0,111	0,120
	Relação clorofila <i>a/b</i>	1,891 <sup>ns</sup>	1,972	2,243
	Proteínas (mg g <sup>-1</sup> )	62,09 a	44,59 b	45,14 b
	Acúcares totais (mg g <sup>-1</sup> )	462,81 a	428,85 ab	369,72 b

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>ns</sup>: não significativo.

Uma estratégia adaptativa das espécies vegetais em condições de autossombreamento é o aumento da proporção relativa de clorofila *b*. Plantas mais sombreadas recebem maior proporção de radiação difusa e rica em vermelho extremo, o que aumenta relativamente a clorofila *b* em relação à clorofila *a*, tornando-a mais eficiente em condições de baixa intensidade de luz (PINTO *et al.*, 2007). Não foram observadas, no entanto, alterações nos teores de clorofila *b* e na relação de clorofila *a/b* em função dos tratamentos (Tabela 6).

Além das diferenças na proporção de clorofilas *a* e *b*, de modo geral, o que se observa é que é que folhas cultivadas sob baixas intensidades de luz, por exemplo, quando submetidas a maior sombreamento, apresentam maiores teores de clorofila por unidade de peso como estratégia compensatória a menor quantidade de radiação disponível (BOARDMAN, 1977; ALMEIDA *et al.*, 2004).

As folhas mais sombreadas minimizam a limitação luminosa através de aumentos na capacidade de captura de luz e diminuição da capacidade de carboxilação e condutância de mesófilo, mas isto não leva invariavelmente a concentrações mais elevadas de clorofila por unidade de área foliar. Na maioria das espécies, os níveis mais elevados de clorofila por unidade de massa fresca e por

cloroplasto nas folhas de sombra são compensados pelo menor número de cloroplastos e uma menor massa fresca por área, o que resulta em um nível praticamente constante de clorofila por unidade de área em folhas de sol e sombra (LAMBERS *et al.*, 2008), ou ainda, em níveis mais elevados de clorofila por área foliar em folhas submetidas a menor autossombreamento, conforme observado no presente trabalho nas menores densidades de plantio. Comportamento semelhante foi observado em *Myrtus communis*, onde se observou maiores concentrações de clorofila por unidade de área foliar em folhas cultivadas a pleno sol (MENDES *et al.*, 2001).

Apesar de nem sempre existir uma correlação linear positiva entre os teores de clorofila e a fotossíntese líquida, em virtude das limitações impostas pela etapa bioquímica, é comum que uma planta com maiores teores de clorofila seja capaz de atingir taxas fotossintéticas mais altas, pelo seu valor potencial de captação de fótons por unidade de tempo (PORRA *et al.*, 1989; CHAPPELLE e KIM, 1992; RÊGO e POSSAMAI, 2004). Em estêvia, Wu *et al.* (2013) relatam que acréscimos nos teores de clorofila aumentam a capacidade de captura de energia solar e podem consistir em um método para incrementar a fotossíntese em cultivos da espécie.

Maiores teores de clorofila foram positivamente relacionados com acúmulo de biomassa e biossíntese de enzimas correlacionadas com o transporte de elétrons, proteínas e carboidratos em plantas de *S. rebaudiana* submetidas a diferentes concentrações de cobre em meio de cultura (JAIN *et al.* 2009), reforçando a ideia de maiores atividades fotossintéticas quando existe um maior teor de clorofilas por área. No presente trabalho observa-se que os maiores valores de clorofila a e total nas menores densidades de plantio (Tabela 6) estão relacionados com as maiores produções de biomassa por planta (Tabela 4).

Além do incremento em biomassa é válido ressaltar que também é descrita uma relação entre o acúmulo de glicosídeos de esteviol, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, com a extensão do desenvolvimento do sistema de membranas do cloroplasto e o teor de pigmentos fotossintéticos (LADYGIN *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2013).

Segundo Jain *et al.* (2009), a relação entre a atividade do aparato fotossintético e a produção de glicosídeos diterpênicos sugere que a síntese de isoprenoides nos cloroplastos seja um fator determinante para a produção das substâncias edulcorantes. A biossíntese de glicosídeos de esteviol e de clorofilas provém dos mesmos precursores, difosfato de isopentenilo (IPP) e difosfato de

dimetilalilo (DMAPP) da via do metileritritol fostato (MEP) nos plastídios (GULERIA *et al.*, 2014), logo, as condições ideais para produção de moléculas de clorofila no início da rota são as mesmas que regulam a produção das substâncias edulcorantes em estévia.

De maneira mais direta, considerando a relação entre teores de clorofila superiores com maior atividade biossintética, é possível associar a produção de glicosídeos de esteviol com a maior disponibilidade de carboidratos oriundos da fotossíntese uma vez que as duas moléculas precursoras para a via do MEP (gliceraldeído-3-fosfato e piruvato) derivam diretamente da fotossíntese ou da glicólise (BARBET-MASSIN *et al.*, 2015).

Com relação aos teores de proteínas, houve variação entre 44,59 e 62,09 mg g<sup>-1</sup> (Tabela 6), valores menores do que os registrados na literatura, onde se encontra relatos de 98 mg g<sup>-1</sup> (SAVITA *et al.*, 2004) até 204,2 mg g<sup>-1</sup> (TADHANI e SUBHASH, 2006), fato atribuído à diferenças genéticas entre os materiais. É conveniente ressaltar ainda que materiais com elevados teores de proteína tendem a apresentara, via de regra, menores teores de açúcares solúveis totais (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

Os teores de açúcares solúveis totais, também referidos como carboidratos totais, dentre os quais estão os glicosídeos diterpênicos (CARVALHO e ZAIDAN, 1999), variaram entre 369,72 e 467,62 mg g<sup>-1</sup> no presente trabalho (Tabela 6), valores próximos aos relatados na literatura, onde se observa relatos de 352 a 619 mg g<sup>-1</sup> (BOONKAEWWAN *et al.*, 2006; ABOU-ARAB *et al.*, 2010; MARCINEK e KREJPCIO, 2015).

Com relação aos tratamentos, as épocas de colheita afetaram os teores de ambas as biomoléculas de maneira semelhante. Percebeu-se decréscimo nos teores à medida que houve evolução do florescimento (Tabela 6).

A redução dos teores de proteínas ocorre devido à redistribuição de compostos nitrogenados das folhas para órgãos reprodutivos ao longo do ciclo da planta, processo que é responsável, inclusive, por regular a absorção de nitrogênio nas raízes. Durante o crescimento vegetativo, o nitrogênio é rapidamente absorvido pelas raízes e transportado para as folhas. Nas folhas, a redução do nitrato produz aminoácidos que são incorporados à proteína foliar. Durante o florescimento e enchimento de grãos, ocorre a remobilização do nitrogênio da proteína foliar e a exportação de aminoácidos para os órgãos reprodutivos é alta, diminuindo os teores

destes compostos na folha (IMSANDE e TOURAINE, 1994; BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000).

Com relação aos açúcares solúveis totais, o processo é similar, envolvendo a remobilização de reservas para os órgãos reprodutivos. É notório um intenso consumo de carboidratos no início do florescimento, para a formação das brotações floríferas, o que resulta na redução dos teores foliares destes compostos (CRUZ *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2014).

Outro aspecto interessante da remobilização de carboidratos em estêvia é a sua função na composição dos glicosídeos diterpênicos. Após a formação da molécula de esteviol, ocorre uma série de glicosilações no citosol, que leva à formação dos diversos compostos adoçantes da planta. Estas reações são catalisadas por glicosiltransferases citosólicas dependentes de UDP (UGTs), enzimas que transferem um resíduo de açúcar de um doador (principalmente UDP-glicose) para uma molécula aceptora (BRANDLE e TELMER, 2007; CEUNEN e GEUNS, 2013c; YANG *et al.*, 2015). Desta maneira é possível inferir que a diminuição dos teores de açúcares totais, observada no início e pleno florescimento esteja também relacionada à biossíntese de glicosídeos de esteviol.

Em estudo realizado por Ceunen e Geuns (2013a) verificou-se que variações ontogenéticas nos teores de glicose foram marcadamente diferentes sob dias curtos e dias longos. Sob dias longos o teor de glicose aumentou cerca de duas vezes depois do início da formação do botão floral. Em condições de dias curtos, todavia, os autores relatam que houve estagnação ou pequeno decréscimo nos teores deste carboidrato, como observado no presente trabalho para carboidratos totais. Esta correlação reforça a tese de que o plantio tardio reduziu sobremaneira o período vegetativo da cultura, fazendo com que tivesse ciclo e modelo de desenvolvimento semelhante ao descrito para a espécie quando submetida à cultivo sob dias curtos.

### 3.3.4 Teor e produtividade de glicosídeos de esteviol

Considerando as variáveis relacionadas à produção de glicosídeos de esteviol, apenas a produtividade de esteviosídeo não apresentou interação significativa entre as densidades de plantio e épocas de colheita. Avaliando os fatores isoladamente, tanto densidades de plantio quanto épocas de colheita foram significativas para todos as variáveis (Anexo 4).



A interação entre a colheita no início do florescimento e a adoção da densidade de plantio de 33.333 plantas ha<sup>-1</sup>, promoveu os maiores rendimentos de esteviosídeo e rebaudiosídeo A. As maiores razões entre rebaudiosídeo A e esteviosídeo foram obtidas na interação entre a colheita no início de florescimento e nas densidades de 33.333 e 166.667 plantas ha<sup>-1</sup>, todavia com teores marcadamente baixos na maior densidade (Tabela 7).

**TABELA 7.** Médias de teores de esteviosídeo, rebaudiosídeo A, relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio e épocas de colheita (antes 'AF'; início 'IF' e pleno florescimento 'PF'). Pinhais/PR (2016).

<b>Esteviosídeo (mg g<sup>-1</sup>)</b>				
Colheitas	Densidades de plantio (plantas ha <sup>-1</sup> )			Média
	<b>166.667</b>	<b>83.333</b>	<b>33.333</b>	
<b>AF</b>	71,02 aA	62,36 aA	67,81 bA	67,06
<b>IF</b>	56,76 bB	48,52 bB	86,98 aA	64,08
<b>PF</b>	43,51 cA	46,29 bA	55,48 bA	48,42
Média	57,09	52,39	70,09	
<b>Rebaudiosídeo A (mg g<sup>-1</sup>)</b>				
<b>AF</b>	26,34 aA	24,82 aA	30,19 bA	27,11
<b>IF</b>	33,60 aB	22,56 aC	47,31 aA	34,48
<b>PF</b>	17,65 bB	20,99 aAB	30,06 bA	22,90
Média	25,86	22,80	35,86	
<b>Relação Rebaudiosídeo A/Esteviosídeo</b>				
<b>AF</b>	0,37 bB	0,40 bAB	0,45 bA	0,40
<b>IF</b>	0,60 aA	0,47 aB	0,54 aA	0,53
<b>PF</b>	0,41 bB	0,45 abB	0,54 aA	0,46
Média	0,46	0,43	0,51	
<b>Esteviosídeo (kg ha<sup>-1</sup>)</b>				
<b>AF</b>	40,76	30,46	15,97	29,06 b
<b>IF</b>	73,21	51,94	39,65	54,94 a
<b>PF</b>	54,60	50,47	39,89	48,32 a
Média	56,19 A	44,29 B	31,84 C	
<b>Rebaudiosídeo A (kg ha<sup>-1</sup>)</b>				
<b>AF</b>	15,14 bA	11,91 bA	7,05 bA	11,36
<b>IF</b>	43,22 aA	24,20 aB	21,35 aB	29,59
<b>PF</b>	22,68 bA	23,70 aA	21,68 aA	22,69
Média	27,02	19,93	16,69	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As produções mais elevadas de glicosídeos de esteviol por massa seca de planta na menor densidade de plantio estão relacionadas com a menor competição das plantas por luz, água e nutrientes. Considerando a relação entre os teores de clorofila a e total (Tabela 6) e uma maior capacidade fotossintética, conforme discutido anteriormente, é possível inferir que o melhor aproveitamento da radiação

por indivíduo promoveu maior acúmulo de precursores e energia para a biossíntese destas moléculas.

Segundo Brandle e Rosa (1992) o principal fator que afeta o teor de glicosídeos diterpênicos é o florescimento, que é induzido pelo comprimento do dia e temperatura. Os teores das substâncias edulcorantes em estévia tendem a aumentar até o início do florescimento, diminuindo continuamente até a produção de sementes, sendo aconselhável, portanto, a colheita das folhas no início da abertura das flores (KANG e LEE, 1981; LIMA-FILHO *et al.*, 2004). Corroborando com estas constatações, observa-se no presente trabalho redução nos teores tanto de esteviosídeo quanto de rebaudiosídeo A na colheita realizada em pleno florescimento, especialmente na maior densidade de plantio. Na menor densidade de plantio, onde havia menor competição entre as plantas, percebe-se que os teores de glicosídeos de esteviol são superiores na colheita de início do florescimento em comparação com as demais (Tabela 7).

Apesar das discordâncias quanto aos mecanismos fisiológicos de regulação do acúmulo de glicosídeos de esteviol, parece consenso que envolvam alteração no perfil de transcrição dos genes envolvidos na via de síntese (CEUNEN e GEUNS, 2013a).

Yang *et al.* (2015) avaliaram a dinâmica de acúmulo de glicosídeos diterpênicos e expressão gênica das enzimas envolvidas. Os autores constataram que o aumento dos teores das substâncias edulcorantes no início do florescimento está positivamente correlacionado com o aumento na transcrição dos genes relacionados. Todos os genes avaliados foram transcritos minimamente em período de crescimento vegetativo, e, boa parte apresentou picos de expressão após o aparecimento do botão floral, dentre estes o *SrUGT74G1*, que codifica a UGT responsável pela síntese de esteviosídeo. Os genes *SrIDI*, *SrKO1* e *SrUGT85C2* (responsáveis pelas enzimas que catalisam a biossíntese de dimetilalil difosfato, ácido caurenóico e esteviomonosídeo, respectivamente) atingiram um pico de transcrição na fase de plena floração.

Considerando a via de síntese compartilhada nas fases iniciais, os autores sugerem que o aumento da transcrição de genes envolvidos na biossíntese de giberelinas forneceu mais precursores para a biossíntese de glicosídeos de esteviol, o que explica o aumento dos teores em relação ao período vegetativo. Como ocorre, todavia, a diminuição da produção destes compostos após o florescimento aparenta

ser um mecanismo mais complexo que ainda está por ser caracterizado (YANG *et al.*, 2015).

Algumas hipóteses para esta redução no acúmulo de glicosídeos de esteviol com o progresso da floração são relacionadas à presença de folhas senescentes com baixos teores destas substâncias (KALANDIA *et al.*, 2004), a remobilização para os órgãos reprodutivos (BONDAREV *et al.*, 2003), ou, ainda um catabolismo *in situ* por glicosidases endógenas (MADORE, 2000), embora boa parte destas suposições tenham sido recentemente contestadas (CEUNEN e GEUNS, 2013b).

Considerando o maior valor econômico de rebaudiosídeo A em comparação ao esteviosídeo, a razão endógena rebaudiosídeo A/esteviosídeo é uma importante medida para avaliar a qualidade de materiais genéticos e práticas de cultivo para extração comercial (YADAV *et al.*, 2011; CEUNEN e GEUNS, 2013b). Observa-se no presente trabalho, que a menor relação se deu com a interação da colheita no florescimento, com a maior densidade de plantio (Tabela 7). Este comportamento se justifica especialmente pela maior produtividade de esteviosídeo na fase de início de florescimento aliado à maior competição entre plantas que pode reduzir o teor de rebaudiosídeo A por planta em função da menor disponibilidade de glicose, produto oriundo da fotossíntese. As maiores relações ocorreram na condição de início de florescimento com densidades de 166.667 e 33.333 plantas ha<sup>-1</sup> e em pleno florescimento na menor densidade de plantio, todavia, nesta época, com teores consideravelmente menores.

Ceunen e Geuns (2013b) avaliaram a variação ontogenética da razão rebaudiosídeo A/ esteviosídeo em função de fotoperíodos. Segundo os autores, uma vez que o esteviosídeo é um precursor direto do rebaudiosídeo A, pode-se considerar que haja uma limitação no fluxo metabólico de rebaudiosídeo A pelos teores de esteviosídeo. De fato, Yang *et al.* (2015) verificaram que a expressão do gene *SrUGT76G1*, responsável pela síntese da enzima que catalisa a conversão de esteviosídeo para rebaudiosídeo A não sofreu alterações nos estádios de floração, enquanto que *SrUGT74G1* (responsável pela enzima que catalisa a biossíntese de esteviosídeo) mostrou maiores flutuações. A partir daí, é possível inferir que o aumento nos teores de rebaudiosídeo A observados na colheita de início do florescimento tenham sido função da conversão do esteviosídeo já sintetizado antes da abertura das flores e não apenas de regulação enzimática.

Com relação à produtividade dos compostos, foi observado maior acúmulo de esteviosídeo nas colheitas de início e pleno florescimento, em função tanto dos teores mais elevados dos compostos na fase de início de florescimento, quanto do aumento do acúmulo de biomassa na fase de pleno florescimento. Quanto às densidades de plantio, o stand de 166.667 plantas ha<sup>-1</sup> promoveu maiores produtividades, em função do maior acúmulo de biomassa por área.

Para as produtividades de rebaudiosídeo A, observou-se interação entre os tratamentos, sendo que a colheita no início de florescimento na maior densidade de plantio atingiu maiores valores (43,22 kg ha<sup>-1</sup>). Observa-se que o maior número de plantas, em interação com a colheita no início do florescimento, compensou o melhor desempenho individual das plantas na menor densidade para os teores de glicosídeos de esteviol, fato também observado por Serfaty *et al.* (2013) e por Kumar *et al.* (2014a), que chegaram a registrar acréscimo de 114,8% no acúmulo de glicosídeos de esteviol na densidade de 111.111 plantas ha<sup>-1</sup> em comparação com a menor densidade avaliada (37.037 plantas ha<sup>-1</sup>).

As produtividades de glicosídeos de esteviol (esteviosídeo + rebaudiosídeo A) obtidas na colheita de início do florescimento e densidade de 166.667 atingiram valores de 116,43 kg ha<sup>-1</sup>, com uma relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo de 0,60.

Em avaliação prévia realizada do acesso em condições de cultivo semelhante, foram registrados uma relação de 0,95 e produtividade de 695 kg ha<sup>-1</sup> no primeiro corte, realizado em fevereiro de 2014 (FRANCISCO, 2015). A já discutida diminuição no período vegetativo em função do plantio tardio pode explicar esta drástica redução.

### 3.4 CONCLUSÕES

A colheita no início do florescimento apresenta maiores teores e produtividades de glicosídeos diterpênicos em função da dinâmica do fluxo de biossíntese destes compostos e do aumento nos valores de biomassa.

A adoção de densidade de 166.667 plantas ha<sup>-1</sup> associada à colheita no início do florescimento promove maiores produtividades de biomassa e glicosídeos de esteviol no genótipo avaliado no presente trabalho.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- ABOU-ARAB, A.; AZZA, A.; FERIAI, M. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. **African Journal of Food Science**, v. 4, n.5, p. 269–281, 2010.
- AHMED, B.; HOSSAIN, M.; ISLAM, R.; SAHA, A. K; MANDAL, A. A review on natural sweetener plant – *Stevia* having medicinal and commercial importance. **Agronomski Glasnik**, v 1. p. 75-92, 2011
- ALMEIDA, L. P.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; ZANELA, S.; VIEIRA, C. V. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 83-88, 2004. DOI: 10.1590/S0103-84782004000100013.
- ANDOLFI, L.; MACCHIA, M.; CECCARINI, L. Agronomic productive Characteristics of Two Genotype of *Stevia rebaudiana* in Central Italy. **Italian Journal of Agronomy**, v. 73, n. 2, p. 257-262, 2006.
- ANKIT. Global *Stevia* / *Stevia rebaudiana* Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography. IndustryARC, 2014.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas**: noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.
- BARBET-MASSIN, C.; GIULIANO, S.; ALLETTO, L.; DAYDÉ, J.; BERGER, M. Nitrogen Limitation Alters Biomass Production but Enhances Steviol Glycoside Concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **PLoS One**, v.10, n.7, p. 1 – 16, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0133067.
- BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.28, p. 355-377, 1977. DOI: 10.1146/annurev.pp.28.060177.002035.
- BONDAREV, N.I.; SUKHANOVA, M.A.; RESHETNYAK, O.V.; NOSOV, A. M. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny, **Biologia Plantarum**, v. 47, n.2, p. 261–264, 2003. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000022261.35259.4f.
- BOONKAEWWAN, C.; TOSKULKAO, C.; VONGSAKUL, M. Anti-Infl ammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.3, p.785–789, 2006. DOI: 10.1021/jf0523465.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

BRANDLE, J. E.; ROSA, N.. Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 72, n.4, p. 1263–1266, 1992.

BRANDLE, J. E.; TELMER, P. Steviol glycoside biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 68, n.14, p. 1855-1863, 2007. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.02.010.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Comércio Exterior. **Programa AliceWeb**. 2016. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em 26/10/2016.

BRÉDA, N. J. J. Ground-based measurements of leaf area index: a review of methods, instruments and current controversies. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 392, p. 2403-2417, 2003. DOI: 10.1093/jxb/erg263.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000. DOI: 10.1590/S0103-84782000000200029.

CARVALHO, M. A. M.; ZAIDAN, L. B. P. Obtenção de estacas de *Stevia rebaudiana* através de estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 201-206, 1995.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Glucose, sucrose, and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. **Biologia Plantarum**, v.57, n. 2, p. 390–394, 2013 a. DOI: 10.1007/s10535-012-0289-6.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Plant Science**, v. 198, p. 72-82, 2013 b. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.10.003.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. **Journal of Natural Products**, v 76, n.6, p. 1201–1228, 2013 c. DOI: 10.1021/np400203b.

CHAPPELLE, E. W.; KIM, M. S. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): na algorithm for a remote estimation of the concentrations of chlorophyll A, chlorophyll B, and carotenoids in soybean leaves. **Remote Sensing of Environment**, v. 39, n. 3, p. 239- 247, 1992. DOI: 10.1016/0034-4257(92)90089-3.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBCS/NRS, 2004. 400p.

CRUZ, M.C.M.; SIQUEIRA, D.L.; SALOMÃO, L.C.C.; CECON, P.R.; SANTOS, D. Teores de carboidratos em limeiras ácidas 'Tahiti' tratadas com paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.2, p.222-226, 2007. DOI: 10.1590/S0100-29452007000200007.

DONALÍSIO, M.G.R.; DUARTE, F.R.; PINTO, A.J.; SOUZA, C.J. Estévia. **Agrônômico**, v.34, n.1, p.65-68, 1982.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, v.28, n.3 p.350-356, 1956. DOI: 10.1021/ac60111a017.

FRANCISCO, F. **Acúmulo de biomassa, produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A e tolerância à geada e ao acamamento de acessos de *Stevia rebaudiana* Bert.** 2015. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015.

FRONZA, D.; FOLEGATTI, M. V. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, p. 595-599, 2003. DOI: 10.1590/S0103-90162003000300028.

GONZÁLEZ, H. R.; LUZ, L. L. A.; SOSA, I. H.; AMITA, M. M. R.; FERRADÁ, C. A. R.; GOVÍN, E.S.; FIGUEREDO, M. M. Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni em Cuba. **Rev Cubana de Plantas Medicinales**, v. 12, n. 4, p. 1 – 5, 2007.

GULERIA, P.; MASAND, S.; YADAV, S. K. Overexpression of *SrUGT85C2* from *Stevia* reduced growth and yield of transgenic *Arabidopsis* by influencing plastidial MEP pathway. **Gene**, v. 539, n. 2, p 250–257, 2014. DOI: 10.1016/j.gene.2014.01.071.

IMSANDE, J., TOURAINÉ, B. N Demand and regulation of nitrate uptake. **Plant Physiology**, v.105, n.1, p.3-7, 1994.

HOLLIDAY, R. Plant population and crop yield. **Nature**, v .186, n.4718, p.22– 24, 1960. DOI: 10.1038/186022b0.

JAIN, P; KACHHWAHA, S; KOTHARI, S. L. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* Bertoni by using high copper levels in the culture medium. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n.3, p. 315-319, 2009. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.08.015.

JARMA, A. O.; CARRANZA, C. G.; CLAVIJO, J. P. Captación y uso de la radiación en plantas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en el Caribe colombiano. **Agronomía Colombiana**, v. 28, n. 1, p. 37-46, 2010.

JARMA, A. O.; RENGIFO, T.; ARAMÉNDIZ, H. Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. **Agronomía Colombiana**, v. 24, n. 1, p. 38-47, 2006.

KALANDIA, A.; PAPUNIDZE G.; VANIDZE, M.; PAPUNIDZE, S. HPLC of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) diterpene glycosides. **Bulletin of the Georgian Academy of Sciences**, v.169, n.1, p. 147-150, 2004.

KANG, K. H.; LEE, E.W. Physio-ecological studies on Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **Korean Journal of Crop Science**, v. 26, n.1, p. 69 – 89, 1981.

KOLB, N.; HERRERA, J.L.; FERREYRA, D.J.; ULIANA, R.F. Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p 4538–4541, 2001.

KÖPPEN, W. **Grundriss Der Klimakunde**. Berlin: W. Guyter, 1931. 390p.

KUMAR, R.; SHARMA, S.; SOOD, S. Yield components, light interception and marker compound accumulation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) affected by planting material and plant density under western Himalayan conditions. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n.12, p 1731–1745, 2014a. DOI: 10.1080/03650340.2014.909029

KUMAR, R.; SOOD, S.; SHARMA, S.; KASANA, R.C.; PATHANIA, V.L.; SINGH, B.; SINGH, R.D. Effect of plant spacing and organic mulch on growth, yield and quality of natural sweetener plant Stevia and soil fertility in western Himalayas. **International Journal of Plant Production**, v. 8, n. 3, p. 311-334, 2014b.

LADYGIN, V. G.; BONDAREV, N.I.; SEMENOVA, G.A.; SMOLOV, A. A; RESHETNYAK, O. V.; NOSOV, A. M. Chloroplast ultrastructure, photosynthetic apparatus activities and production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* *in vivo* and *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n.1, p. 9-16, 2008. DOI: 10.1007/s10535-008-0002-y.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 2.ed. New York: Springer, 2008. 610p.

LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; AH-HEN, K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n.3, p 1121–1132, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140.



LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. **Sistemas de Produção 5: Estévia**. Dourados: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste, 2004. 55p.

LIMA FILHO, O. F. **Análise Quantitativa do Crescimento da Estévia**. Documentos: 60. Dourados: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste, 2004. 29p.

MADAN, S. AHMAD, S.; SINGH, G. N.; KOHLI, K.; KUMAR, Y.; SINGH, R.; GARG, M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – A Review. **Indian Journal of Natural Products and Resources**. v. 1, n.3, p. 267–286, 2010.

MADORE, M. A. Synthesis and degradation of diterpene glycosides in source leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Plant Biology (Rockville)**, v. 129, 2000.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. *In*: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. EPU/EDUSP, São Paulo. 1979. v. 1, p. 331-350.

MANDAL, S.; EVELINA, H.; GIRI, B.B.; SINGHA, V.P.; KAPOOR, R. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 187–194, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.07.003.

MARCINEK, K.; KREJPCIO, Z. *Stevia rebaudiana* Bertoni – Chemical composition and functional properties. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v.14, n. 2, p. 145 – 152, 2015. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.2.16.

MEJEGI, N. W.; KUMAR, J. K.; SINGH, V.; KAUL, V. K. AHUJA, P. S. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. **Current Science**. v. 88, n. 5, p. 801-804, 2005.

MENDES, M. M.; GAZARINI, L. C.; RODRIGUES, M.L. Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments - effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. **Environmental and Experimental Botany**, v.45, n.2, p.165-178, 2001. DOI: 10.1016/S0098-8472(01)00073-9.

MORAES, R. M.; DONEGA, M. A.; CANTRELL, C.L.; McCHESNEY, J.D. Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. **Industrial Crops and Products**. v. 51, p. 385-389. 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.09.025.

MOREIRA, R. A.; CRUZ, M. C. M.; FAGUNDES, M. C. P.; PANTOJA, L. A. SANTOS, A. S. Carboidratos foliares durante a floração e os estádios iniciais de crescimento de frutinhos em tangerineira 'Ponkan'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 34-39, 2014. DOI: 10.1590/S0100-204X2014000100005.

PAL, P. K.; MAHAJAN, M.; PRASAD, R.; PATHANIA, V.; SINGH, N.; AHUJA, P.S. Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 556–564, 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.060.

PAL, P. K.; PRASAD, R.; PATHANIA, V. Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 17, p. 1526-1535, 2013. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.06.017.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, J. C. W.; CASTRO, E. M.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MELO, L. A.; DOUSSEAU, S. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-doBrasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.2, p.210-4, 2007. 10.1590/S0102-05362007000200016.

POORTER, H.; GARNIER, E. Ecological significance of inherent variation in relative growth rate and its components. *In*: Pugnaire, F.I.; VALLADARES, F. (Eds). **Handbook of functional plant**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.81–120.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophylls standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 975, n.3, p. 384-394, 1989. DOI: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0.

RAMESH, K.; SINGH, V.; AHUJA, P. S. Production potential of *Stevia rebaudiana*(Bert.) Bertoni. under intercropping systems. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 53, n.4, p. 443–458, 2007. DOI: 10.1080/03650340701474949.

RÊGO, G.M.; POSSAMAI, E. **Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas de Jequitibá-Rosa (*Cariniana legalis*)**. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 2004. 04 p.

SAVITA, S.; SHEELA, K.; SUNANDA, S.; SHANKAR, A.; RAMAKRISHNA, P. *Stevia rebaudiana* – A functional component for food industry. **Journal of Human Ecology**, v.15, n.4, p.261–264, 2004

SCHWERZ, F.; CARON, B. O.; ELLI, E. F.; OLIVEIRA, D. M.; MONTEIRO, G. C.; SOUZA, V. Q. Avaliação do efeito de doses e fontes de nitrogênio sobre variáveis morfológicas, interceptação de radiação e produtividade do girassol. **Revista Ceres**, v. 63, n. 3, p. 380–386, 2016. DOI: 10.1590/0034-737X201663030015.

SERFATY, M.; IBDAH, M.; FISCHER, R.; CHAIMOVITSH, D.; SARANGA, Y.; DUDAI, N. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and Harvesting

regimes. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 731-736, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.08.063.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Comparison of means of agricultural experimentation data through different tests using the software Assistat. **African Journal of Agricultural Research**, Lagos, v.37, n. 11, p.3527-3531, 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11523.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005. DOI: 10.1590/S0103-84782005000300043.

TADHANI, M.; PATEL, V.; SUBHASH, R. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.4, p. 323–329, 2007. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.08.004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

WATSON, D.J. Comparative physiological studies on growth of field crops. I. Variation in net assimilation rate and leaf area between species and varieties, and within and between years. **Annals of Botany**, v.11, n. 1, p. 41-76, 1947.

WU, J.; WANG, Y.; LIN, X. Purple Phototrophic Bacterium Enhances Stevioside Yield by *Stevia rebaudiana* Bertoni via Foliar Spray and Rhizosphere Irrigation. **PLoS One**, v.8, n.6, p. 1 – 5, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0067644

YADAV, A. K.; SINGH, S.; DHYANI, D.; AHUJA, P. S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, v 91, n.1, p. 1–27, 2011. DOI: 10.4141/cjps10086.

YANG, Y.; HUANG, S.; HAN, Y.; YUAN, H.; GU, C.; WANG, Z. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.86, p.174-180, 2015. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.12.004.

#### 4 ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CULTIVADAS EM DIFERENTES ESPAÇAMENTOS

##### RESUMO

*Stevia rebaudiana* Bertoni é uma espécie que se caracteriza pela produção de metabólitos secundários denominados glicosídeos diterpênicos, moléculas sem valor calórico e alto potencial adoçante. As produzidas em maior quantidade são o esteviosídeo e rebaudiosídeo A. A produção destes compostos é afetada por diversos fatores, dentre os quais se destacam a distribuição espacial no perfil da planta e radiação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo de biomassa e glicosídeos diterpênicos nos segmentos apical, mediano e basal de um genótipo de *S. rebaudiana* cultivado em diferentes espaçamentos, relacionando as alterações na dinâmica produtiva com adaptações estruturais em função da radiação. O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial 3 x 3 (três espaçamentos e três segmentos de planta). Os espaçamentos utilizados foram de 20x30; 40x50 e 50x60 centímetros entre plantas e linhas, respectivamente. Avaliaram-se os segmentos apical, mediano e basal. O segmento apical no espaçamento de 50x60 cm apresentou os maiores valores de massa seca de folhas (11,61g) ao passo que as respostas em produtividades de biomassa de folhas foram maiores valores no espaçamento de 20x30 cm (média dos três segmentos de 420,67 kg ha<sup>-1</sup>). Apesar dos efeitos do espaçamento na biomassa total, a contribuição dos segmentos apical, mediano e basal foi de aproximadamente 54; 32 e 14% da biomassa total de folha nas plantas, respectivamente, mantendo-se praticamente constante. A competição entre plantas nos diferentes espaçamentos promoveu alterações estruturais na espessura do limbo foliar e densidade de tricomas tectores e glandulares. Os teores de rebaudiosídeo A e esteviosídeo não demonstraram relação com as adaptações e caracteres anatômicos avaliados, apresentando tendência de maior acúmulo em folhas da região mediana. A maior disponibilidade de luz no espaçamento menos adensado em interação com a região apical promoveu maiores teores de rebaudiosídeo A (35,59 mg g<sup>-1</sup>), enquanto que o esteviosídeo mostrou tendência de maior acúmulo na região mediana da planta, independentemente dos espaçamentos.

**Palavras-chave:** Dossel, estêvia, esteviosídeo, rebaudiosídeo A, tricomas.

## MORPHOLOGICAL ADAPTATIONS AND SPATIAL ALLOCATION OF BIOMASS AND DITERPENIC GLYCOSIDES IN PLANTS OF *Stevia rebaudiana* CULTIVATED IN DIFFERENT SPACINGS

### ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* Bertoni is a species characterized by the production of secondary metabolites called diterpene glycosides, molecules with no calorific value and high sweetening potential. Those produced in greater quantity are stevioside and rebaudioside A. Diterpene glycosides production is influenced by several factors, including the spatial distribution in the plant canopy and radiation. Thus, the objective of this research was to evaluate the accumulation of biomass and diterpene glycosides in the apical, median and basal segments of a *S. rebaudiana* genotype grown at different plant spacings, relating the changes in the productive dynamics with structural adaptations triggered by the radiation. The experimental design was in randomized blocks in a 3 x 3 factorial scheme (three spacings and three plant segments). The used spacings were 20x30; 40x50 and 50x60 centimeters between plants and lines, respectively. The apical, median and basal segments were evaluated. The apical segment at the spacing of 50x60 cm had the highest values of leaf dry mass (11.61 g), while the responses in leaf biomass yields were higher in the spacing of 20x30 cm (mean of the three segments= 420.67 Kg ha<sup>-1</sup>). Despite the effects of spacing on the total biomass, the contribution of the apical, median and basal segments was approximately 54; 32 and 14% of the total leaf biomass in the plants, respectively, remaining almost constant. The competition between plants at different spacings promoted structural changes in leaf limb thickness and density of glandular and non-glandular trichomes. The levels of rebaudioside A and stevioside did not show any relation with the adaptations and anatomical characters evaluated, showing tendency of greater accumulation in leaves of the median region. The greater availability of light in the less densely spaced planting associated with the apical region, promoted higher levels of rebaudioside A (35.59 mg g<sup>-1</sup>), whereas stevioside showed a tendency of greater accumulation in the median region of the plant, independently of the spacings.

**Key words:** Canopy, rebaudioside A, stevia, stevioside, trichomes.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Stevia* compreende cerca de 200 espécies de ervas e arbustos na família *Asteraceae* (MISHRA *et al.*, 2010). A espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni, popularmente conhecida como estévia, destaca-se entre as do gênero pela produção de metabólitos secundários denominados glicosídeos diterpênicos ou glicosídeos de esteviol. Estas substâncias são caracterizadas pelo alto potencial edulcorante aliado à ausência de valor calórico (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

Já foram isolados e identificados mais de 30 glicosídeos de esteviol em concentrações variáveis (WÖLWER-RIECK, 2012). Dentre estes o esteviosídeo e rebaudiosídeo A são os produzidos em maior quantidade e, portanto, possuem maior importância mercantil. Além de sensorialmente mais doce, o rebaudiosídeo A não apresenta sabor amargo residual característico do esteviosídeo, possuindo, dessa forma, valor comercial mais elevado (GOTO e CLEMENTE, 1998). Programas de melhoramento para estévia têm focado justamente na maior produção de folhas e concentração maior de rebaudiosídeo A, visando aumentar a relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo, característica desejável para a indústria (YADAV *et al.*, 2011).

A produção destes compostos é afetada por diversos fatores, dentre os quais se destacam a fase ontogenética, fotoperíodo, distribuição espacial no perfil da planta, temperatura, disponibilidade de nutrientes e radiação (BONDAREV *et al.*, 2003; CEUNEN e GEUNS, 2013b).

Quanto à distribuição espacial no dossel da cultura, normalmente o conteúdo de glicosídeos é maior em folhas jovens em crescimento próximas ao ápice da planta apresentando decréscimo constante em direção às folhas basais senescentes. No entanto, padrão diferente é observado em plantas em florescimento sob condições de dias curtos, apresentando maior acúmulo de glicosídeos de esteviol em folhas do terço mediano e níveis menores próximo do ápice e base da planta (CEUNEN e GEUNS, 2013a; 2013b).

A dinâmica da radiação ao longo do dossel é um dos fatores que pode influenciar a produção de compostos edulcorantes. Em cultivos com maior capacidade de interceptação de radiação fotossinteticamente ativa existe um aumento no total de assimilados disponíveis para distribuição nas folhas (KUMAR *et al.*, 2014a). Nesse sentido, o espaçamento tende a exercer função tanto na

produção de biomassa total quanto na acumulação de glicosídeos diterpênicos pela influência na radiação incidente ao longo do perfil da planta e por unidade de área.

Além da influência na produtividade, modificações na dinâmica da radiação podem também ocasionar alterações anatômicas em espécies vegetais, como modificações na espessura da folha, densidade estomática, número e tamanho das células epidérmicas, número de tricomas, tamanho dos espaços intercelulares, entre outros (CASTRO *et al.*, 2007; LAMBERS *et al.*, 2008).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo de biomassa e glicosídeos diterpênicos nos segmentos apical, mediano e basal de um genótipo de *Stevia rebaudiana* submetido a cultivo em diferentes espaçamentos, relacionando as alterações na dinâmica produtiva com adaptações estruturais desencadeadas pela interceptação da radiação ao longo do dossel.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

A implantação, condução, material vegetal e produção de mudas referentes a este capítulo são os mesmos descritos para o capítulo 3 (página 49 a 51). A colheita foi realizada 110 dias após o florescimento, ocasião em que o cultivo estava em fase de pleno florescimento.

A colheita, determinação da massa seca de folhas, massa seca de segmento, área foliar e cálculo dos índices fisiológicos em cada segmento foram realizados nas mesmas condições do descrito no item 3.2.4 na página 52.

As análises dos teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram realizadas de acordo com metodologia adaptada de Kolb *et al.* (2001), conforme descrito no item 3.2.8, página 53 a 54.

### 4.2.1 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 x 3 (três espaçamentos e três segmentos da planta), com 4 repetições. Cada parcela possuía 25 plantas, sendo 16 plantas de bordadura e nove plantas úteis. O tamanho das parcelas foi variável em função dos diferentes espaçamentos.

Os espaçamentos utilizados foram 0,60 x 0,50 m; 0,40 x 0,30 m; e 0,30 x 0,20 m (correspondentes às densidades 33.333; 83.333 e 166.667 plantas ha<sup>-1</sup> avaliadas

no capítulo 3 em interação com épocas de colheita). Os segmentos avaliados foram apical, mediano e basal, obtidos a partir da divisão em três frações de igual comprimento da parte aérea da planta.

#### 4.2.2 Análises morfológicas

Fragmentos da região mediana do limbo foram coletados e fixados em FAA 70 (JOHANSEN, 1940). Para as análises em microscopia eletrônica de varredura, o material foi desidratado em álcool etílico, em seguida, submetido ao ponto crítico de CO<sub>2</sub> em equipamento Bal-Tec CPD 030, montado em *stubs* de alumínio com fita de cobre adesiva e metalizado com ouro em equipamento Balzers union FL 9496 SCD 030. As eletromicrografias foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM – 6360LV (Jeol Ltd, Tokyo, Japan), no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Realizou-se a contagem de tricomas tectores grandes, tricomas tectores pequenos e tricomas glandulares apenas na superfície adaxial das folhas, considerando que, conforme relatado na literatura, não há diferença no número destas estruturas em ambas as superfícies (BONDAREV *et al.* 2010). A contagem foi realizada em área de 0,07cm<sup>2</sup>, em dois fragmentos de folha de cada tratamento.

Para as medições de espessuras do limbo foliar e parênquimas clorofilianos foram confeccionadas lâminas semipermanentes do terço mediano, obtidos por meio de cortes à mão livre. As secções foram clarificadas em solução a 20% de hipoclorito de sódio (FOSTER, 1949), coradas com azul de toluidina 0,05%, montadas em glicerina 40% e vedadas com esmalte incolor (BERLYN e MIKSCHE, 1976).

As imagens das secções transversais da lâmina foliar foram projetadas em folha de papel, por meio de câmara clara acoplada à microscópio óptico. Os limites de abrangência das estruturas foram delimitados e as medidas lineares obtidas em cm. A conversão das medidas em µm se deu por meio de fator de correção obtido com lâmina micrometrada. Cada uma das 4 repetições foi composta pela média de 4 segmentos de folhas de cada parcela. De cada segmento de plantas foram medidos 10 áreas.



#### 4.2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste Bartlett para verificação da homogeneidade de variâncias, e, quando homogêneas, realizou-se análise de variância ANOVA e teste de separação de médias Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se o programa estatístico ASSISTAT® (SILVA e AZEVEDO, 2016).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Acúmulo e produtividade de biomassa

A interação entre segmentos de planta e espaçamentos foi significativa apenas para massa seca de folhas por segmento. Avaliando os fatores isoladamente, o espaçamento foi significativo para todas as variáveis e o segmento de planta foi significativo apenas para massa seca de folhas por segmento e produtividade de massa seca de folhas (Anexo 5).

O espaçamento de 50 x 60 cm, menos adensado, promoveu maiores valores de massa seca de folhas no segmento apical, seguido por mediano e basal. No espaçamento de 20x30 cm houve menor diferença entre os segmentos, sendo apenas possível observar maior produção de folhas no segmento apical em comparação ao basal. Para o segmento basal não houve diferença estatística entre os espaçamentos para massa seca de folhas, ao passo que para o segmento apical verificou-se produção de folhas quase três vezes superior no espaçamento menos adensado em comparação com 20 x 30 cm (Tabela 1).

**TABELA 1.** Médias de massa seca de folhas em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. Pinhais/PR (2016).

<b>Massa seca de folhas por segmento de planta (g)</b>				
Espaçamentos	Segmento de planta			Média
	<b>Apical</b>	<b>Mediano</b>	<b>Basal</b>	
<b>20x30 cm</b>	4,01 bA	2,29 bAB	1,27 aB	2,52
<b>30x40 cm</b>	6,47 bA	3,57 bB	1,69 aB	3,91
<b>50x60 cm</b>	11,61 aA	7,01 aB	2,89 aC	7,17
Média	7,36	4,29	1,94	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação entre os fatores está relacionada, principalmente, à maior disponibilidade de radiação potencializada na região apical quando utilizado o menor

espaçamento. No espaçamento mais adensado a porção basal é mais sombreada, logo, dispõe de menos radiação para a produção de biomassa, uma vez que a radiação fotossinteticamente ativa captada por um vegetal determina a quantidade de matéria seca produzida e a qualidade da produção, influenciando o crescimento e produtividade do cultivo (RAFFO e IGLESIAS, 2004). Em trabalho realizado por Jarma *et al.* (2006), de maneira semelhante ao observado no presente estudo, percebeu-se que plantas expostas a baixos níveis de radiação fotossintética apresentaram valores reduzidos de área foliar, massa seca e número de folhas, mostrando crescimento lento e ineficiência fotossintética.

Apesar de maiores valores de massa seca de folhas e massa seca de parte aérea por segmento individual no espaçamento 50x60 cm, as respostas em produtividades de biomassa de folhas e de parte aérea tiveram comportamento inverso, com maiores valores no espaçamento de 20 x 30 cm (Tabela 2). A maior produção de biomassa por planta em menores densidades está associada à menor competição por a luz solar e recursos do solo, enquanto que as produtividades superiores em plantios mais adensados são função do maior número de plantas na parcela, compensando as vantagens individuais (KUMAR *et al.*, 2014a).

**TABELA 2.** Médias de massa seca de parte aérea (MSPA) e produtividades de massa seca de folhas (PMSF) e massa seca de parte aérea (PMSPA) em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. Pinhais/PR (2016).

Espaçamentos		20x30 cm	30x40 cm	50x60cm
	<b>Variação</b>			
	MSPA (g)	5,35 c	8,92 b	12,82 a
	PMSF (kg ha <sup>-1</sup> )	420,67 a	325,74 b	238,96 b
Segmentos de planta	PMSPA (kg ha <sup>-1</sup> )	892,23 a	742,93 a	427,26 b
		Apical	Mediano	Basal
	<b>Variação</b>			
	MSPA (g)	10,12 <sup>ns</sup>	8,53	8,44
	PMSF (kg ha <sup>-1</sup> )	531,62 a	304,20 b	149,55 c
	PMSPA (kg ha <sup>-1</sup> )	744,24 <sup>ns</sup>	634,41	683,77

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). <sup>ns</sup>: não significativo.

Apesar do efeito do espaçamento na produção por planta e produtividade de massa seca de folhas, a proporção relativa dos segmentos para esta variável manteve-se praticamente constante. Observa-se que os segmentos apical, mediano e basal contribuem com aproximadamente 54; 32 e 14% da biomassa total de folhas nas plantas, respectivamente. Padrão diferente é observado na produção de massa

seca de parte aérea, que não difere entre os segmentos. Este fato se explica pela compensação da biomassa de folhas superior no segmento apical pela biomassa dos ramos, maior nos terços mediano e basal. Dados semelhantes foram reportados para cultivares de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.), nas quais a parte apical é composta de tecidos mais jovens ainda em processo de diferenciação celular e o peso seco do segmento basal é, em grande parte, determinado pelo colmo, já bastante maduro e lignificado (DESCHAMPS e ALVES de BRITO, 2001).

As maiores produtividades de biomassa observadas no plantio mais adensado e no segmento apical das plantas podem estar associadas ao aumento do índice de área foliar (Tabela 5), que, conseqüentemente aumenta a interceptação de radiação fotossinteticamente ativa, estimulando o crescimento da cultura e a produção de fotoassimilados para distribuição nas folhas (KUMAR *et al.*, 2014a). Neste sentido, a compreensão da dinâmica de acúmulo de biomassa no perfil da planta e nos diferentes espaçamentos passa pelo entendimento dos índices fisiológicos relacionados à eficiência fotossintética da planta, assunto discutido no tópico seguinte.

#### 4.3.2 Índices fisiológicos

Houve efeito de interação dos espaçamentos e segmento de plantas para índice de área foliar e razão de peso foliar. Analisando os fatores isoladamente, tanto o fator espaçamento quanto o segmento da planta foram significativos para área foliar específica e razão de área foliar (Anexo 6).

O maior índice de área foliar (1,04) foi obtido na porção apical das plantas com o emprego do espaçamento de 20 x 30 cm, mais adensado. O menor valor foi verificado na porção basal com o espaçamento menos adensado, atingindo 0,10. (Tabela 3).

Os maiores valores de IAF observados na região apical são ocasionados pelas características intrínsecas do acesso, que apresenta maior concentração de folhas nesta região, potencializada pelo aumento de plantas por área na maior densidade. Considerando o IAF como a área total unilateral de tecido foliar por unidade de área de superfície do solo (WATSON, 1947), é esperado que haja um aumento conforme sejam empregadas densidades de plantio mais elevadas, uma vez que em culturas comerciais a área do solo disponível é corresponde ao espaçamento estabelecido (LIMA-FILHO *et al.*, 2004). Comportamentos

semelhantes de IAF foram observados em cultivos de *S. rebaudiana* na Colômbia (JARMA *et al.*, 2010) e no Himalaia (KUMAR *et al.*, 2014b).

**TABELA 3.** Médias de índice de área foliar, área foliar específica, razão de peso foliar e razão de área foliar em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. Pinhais/PR (2016).

<b>Índice de área foliar</b>				
Espaçamentos	Segmento de planta			Média
	<b>Apical</b>	<b>Mediano</b>	<b>Basal</b>	
<b>20x30 cm</b>	1,04 aA	0,56 aB	0,23 aC	0,61
<b>30x40 cm</b>	0,65 bA	0,34 bB	0,12 aC	0,37
<b>50x60 cm</b>	0,39 cA	0,22 bAB	0,10 aB	0,23
Média	0,69	0,37	0,15	
<b>Área foliar específica (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)</b>				
<b>20x30 cm</b>	11,69	9,81	5,72	9,53 a
<b>30x40 cm</b>	8,03	7,65	5,64	7,11 b
<b>50x60 cm</b>	8,01	7,56	8,36	7,98 b
Média	9,24 A	8,34 AB	7,03 B	
<b>Razão de peso foliar (g g<sup>-1</sup>)</b>				
<b>20x30 cm</b>	0,73 aA	0,48 aB	0,22 aC	0,47
<b>30x40 cm</b>	0,66 aA	0,43 aB	0,20 aC	0,43
<b>50x60 cm</b>	0,77 aA	0,56 aB	0,29 aC	0,54
Média	0,72	0,49	0,24	
<b>Razão de área foliar (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)</b>				
<b>20x30 cm</b>	11,51	7,07	2,51	7,03 a
<b>30x40 cm</b>	8,35	5,03	1,68	5,02 b
<b>50x60 cm</b>	7,66	5,25	2,94	5,28 b
Média	9,17 A	5,78 B	2,38 C	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Além do IAF, outro índice fisiológico importante para compreensão da dinâmica produtiva de cultivos é a área foliar específica (AFE). Segundo Poorter e Garnier (1999), a AFE expressa a razão entre a área foliar e massa seca da folha. É considerado um índice importante do ponto de vista fisiológico por representar a alocação da biomassa da folha por unidade de área.

No presente trabalho observou-se que o espaçamento mais adensado promoveu maiores valores de AFE em relação aos demais, comportamento justificado pela maior competição e consequente sombreamento nesta condição. De modo geral, plantas mais sombreadas investem, relativamente, maior proporção de fotoassimilados no aumento da área foliar, para maximizar a captação da luz disponível, aumentando AFE e apresentando folhas com menor densidade de massa (LAMBERS *et al.*, 2008). O aumento da AFE em condições de maior sombreamento pode estar relacionado com as adaptações anatômicas que ocorrem

nas plantas em condições de baixa intensidade luminosa, como diminuição na espessura de epiderme e mesófilo, e menor proporção de parênquima paliádico, de tecidos condutores e de sustentação, (BERLYN e CHO, 2000; GOBBI *et al.*, 2011).

Com relação aos segmentos de planta, o terço apical apresentou maior área foliar específica que o terço basal. A primeira vista este comportamento pode parecer atípico, uma vez que, considerando o efeito da intensidade luminosa, folhas basais, mais sombreadas, deveriam apresentar os menores valores. É importante ressaltar, no entanto, que no presente trabalho considerou-se a planta como um organismo dinâmico no qual tecidos jovens e maduros contribuem para a composição da estrutura. Assim, a parte apical apresenta predominância de tecidos bastante jovens, com folhas recém expandidas ou em expansão e entrenós em processo de alongamento. Na região mediana, encontraram-se folhas desenvolvidas, maduras, e na região basal, folhas maduras, boa parte já senescentes e caules mais espessos e lignificados. Desse modo, pode-se considerar que os tecidos de cada uma dessas regiões apresentam características próprias a cada fase de crescimento da planta (DESCHAMPS e ALVES de BRITO 2001).

Os menores valores de AFE em folhas basais, desta forma, se justificam pelo fato de que à medida que avança a maturidade da planta, aumenta a proporção dos tecidos condutores e mecânicos nas folhas o que, por sua vez, provoca uma redução na área foliar específica (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Ainda considerando a diferença no desenvolvimento dos tecidos no perfil da planta, é notável que no segmento basal, em todos os espaçamentos, também há uma diminuição em outro índice, a razão de peso foliar (RPF).

De maneira geral, a RPF representa a fração de matéria seca não exportada das folhas para outras partes da planta. A taxa de exportação de fotoassimilados da folha é uma característica genética, porém sob forte influência de variáveis ambientais (BENINCASA, 2003). Para a cultura da estêvia este índice representa também o índice de colheita, uma vez que, via de regra, apenas as folhas possuem interesse comercial.

Maiores valores de RPF no segmento apical em relação aos segmentos mediano e basal, em todos os espaçamentos, estão relacionados à um maior desenvolvimento e lignificação dos caules nestas regiões e à maior proporção de folhas ainda em desenvolvimento na região do ápice. A maior alocação de matéria

seca nas folhas na região apical, nos três espaçamentos avaliados, constitui indicativo de que estes órgãos são dreno metabólico preferencial no segmento.

No ápice da planta, com predominância de folhas jovens ainda em desenvolvimento, as folhas se comportaram como fonte-dreno, uma vez que são responsáveis pela produção de fotoassimilados e também o órgão com maior armazenamento de compostos (LOPES *et al.*, 2011; MARTINAZZO *et al.*, 2015). À medida que o tecido foliar apresenta maior maturidade, como observado no segmento basal, ocorre direcionamento de assimilados das folhas para frutos, raízes e caules, aumentando sua proporção relativa na biomassa e diminuindo a RPF.

AFE e RPF são, respectivamente, os componentes morfoanatômico e fisiológico da razão de área foliar (RAF). A RAF representa a relação entre a área foliar utilizada para assimilar carbono e a massa seca total acumulada, expressando a eficiência da área foliar da planta utilizada para a fotossíntese (BENINCASA, 2003).

O espaçamento de 20 x 30 cm apresentou os maiores valores para esta variável (Tabela 3). Possivelmente o maior autossombreamento desencadeado nesta condição promoveu um investimento superior no tecido da folha para conseguir uma maior captação de luz, como foi observado para a AFE. Comportamento semelhante foi relatado por JARMA *et al.* (2006) para cultivo de estêvia no Caribe colombiano, onde se observou incremento de RAF a medida que houve diminuição da radiação incidente.

Para *Mentha arvensis* L. (CHAGAS *et al.*, 2010) e *Melissa officinalis* (MARTINS *et al.*, 2008), também foram verificadas diminuições da RAF em plantas com maior exposição à radiação. Segundo estes autores, a redução da RAF nas plantas cultivadas a pleno sol permite que menos material vegetal seja exposto a eventuais danos causados pela alta intensidade de luz. O aumento da RAF em condições de maior sombreamento é, portanto, um indicativo da capacidade da planta de se adaptar às diferentes condições de luminosidade (AGUILERA *et al.*, 2004; CHAGAS *et al.*, 2010).

Considerando o perfil da planta, maiores valores de RAF foram observados no segmento apical, seguido do mediano e basal. Apesar dos efeitos da maior radiação incidente no segmento apical, os valores superiores podem ser justificados pela distribuição dos fotoassimilados desta região para os demais segmentos e pela presença de tecidos jovens em crescimento.

O aumento da área de folhas em espécies vegetais tem como objetivo elevar o potencial de fonte pela maior captação de energia luminosa para o processo fotossintético, visando à manutenção estrutural e o crescimento vegetal. (MARTINAZZO *et al.*, 2015). Nesse sentido, pode-se inferir que o aumento da área foliar e consequente aumento da RAF no segmento apical foi necessário para fornecer fotoassimilados dentro do próprio segmento, e, também, para sustentar o crescimento, especialmente em espessura de caules, nas regiões mediana e basal, mais sombreadas, e, possivelmente com menor eficiência fotossintética.

A tendência de redução da RAF nos segmentos com menor proporção de tecidos jovens é justificada pela maior ocorrência de estruturas não assimilatórias como caules e flores, que passam a ser os drenos metabólicos preferenciais para distribuição de assimilados (LOPES e MAESTRI, 1973). Os menores valores de RAF nos segmentos basal e mediano não representam, portanto, maior eficiência fotossintética nestes segmentos, e são, provavelmente, reflexo da menor área foliar em função da arquitetura do genótipo e da senescência.

Os índices fisiológicos são ferramentas importantes para compreender os mecanismos de defesa e as implicações da radiação nas dinâmicas produtivas de espécies vegetais. Além destes índices, o estudo de eventuais adaptações anatômicas também pode fornecer informações importantes para a compreensão da do crescimento e da produção de metabólitos secundários em espécies de interesse.

#### 4.3.3 Adaptações morfológicas

Os vegetais podem apresentar uma série de adaptações anatômicas em respostas ao ambiente. Dentre essas modificações, a presença de superfícies refletoras, tricomas e maior espessura das folhas podem indicar adaptações das plantas à elevada incidência luminosa, como prevenção ao dessecamento e superaquecimento (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As folhas de estêvia avaliadas no presente trabalho apresentaram mesófilo dorsiventral, e conforme relatado na literatura, parênquima paliçádico formado por uma ou duas camadas e parênquima esponjoso com vários estratos, dispostos irregularmente (BRASIL, 2010). Algumas alterações, no entanto, foram verificadas na espessura do limbo e dos parênquimas paliçádico em função dos tratamentos.

A interação entre os fatores espaçamento e segmento de planta foi significativa para as variáveis de espessura total do limbo foliar e espessura de parênquimas paliçádico e lacunoso. Avaliando os fatores isoladamente, o segmento da planta foi significativo para a porcentagem de parênquima paliçádico no limbo foliar (Anexo 7).

A espessura total do limbo foliar foi menor em folhas do segmento apical em relação às basais em todos os espaçamentos avaliados. Comportamento semelhante foi observado para a espessura do parênquima lacunoso, superior em folhas do segmento basal, exceto no espaçamento de 20x30 cm, onde não houve diferenças entre os segmentos para esta variável. (Tabela 4). Este comportamento se justifica, corroborando com o relatado para a área foliar específica, pelo predominância de tecidos jovens não totalmente expandidos na região apical. A maior espessura, neste sentido, não se dá em função das adaptações à radiação, mas sim em função de diferenças na maturidade dos tecidos.

**TABELA 4.** Médias de espessura de parênquimas lacunoso e paliçádico, espessura total do limbo foliar e porcentagem relativa de parênquima paliçádico no limbo foliar em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. Pinhais/PR (2016).

<b>Espessura do limbo foliar (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
Espaçamentos	Segmento de planta			Média
	<b>Apical</b>	<b>Mediano</b>	<b>Basal</b>	
<b>20x30 cm</b>	320,87 aB	327,03 abB	348,29 abA	332,06
<b>30x40 cm</b>	303,63 abB	306,76 bB	359,30 aA	323,23
<b>50x60 cm</b>	295,16 bB	339,58 aA	338,33 bA	324,36
Média	306,55	324,46	348,964	
<b>Espessura do parênquima paliçádico (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
<b>20x30 cm</b>	126,79 aB	140,01 aA	128,74 aB	131,85
<b>30x40 cm</b>	121,12 aB	124,99 bAB	135,81 aA	127,30
<b>50x60 cm</b>	121,26 aB	144,033 aA	130,68 aB	131,99
Média	123,06	136,34	131,74	
<b>Espessura do parênquima lacunoso (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
<b>20x30 cm</b>	144,86 aA	147,79 aA	163,08 aA	151,91
<b>30x40 cm</b>	129,46 aB	139,76 aB	184,53 aA	151,25
<b>50x60 cm</b>	136,39 aB	157,13 aAB	168,09 aA	153,87
Média	136,91	148,22	171,90	
<b>Porcentagem relativa de parênquima paliçádico no limbo foliar(%)</b>				
<b>20x30 cm</b>	39,54	42,81	37,97	40,10 <sup>ns</sup>
<b>30x40 cm</b>	40,01	40,74	37,95	39,56
<b>50x60 cm</b>	41,05	42,44	38,63	40,71
Média	40,20 AB	41,99 A	38,18 B	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Analisando, entretanto, apenas as folhas dos segmentos mediano e basal, ambas totalmente expandidas e desenvolvidas, é possível observar certo grau de plasticidade em função da radiação. E espessura do parênquima paliçádico no segmento mediano foi superior ao segmento basal nos espaçamentos de 20x30 e 50x60 cm, enquanto que o parênquima lacunoso foi mais espesso no segmento basal em relação ao mediano no espaçamento 30x40cm. Estas alterações refletem na alteração da porcentagem relativa de parênquima paliçádico no limbo foliar, maior em plantas do segmento mediano (Tabela 4).

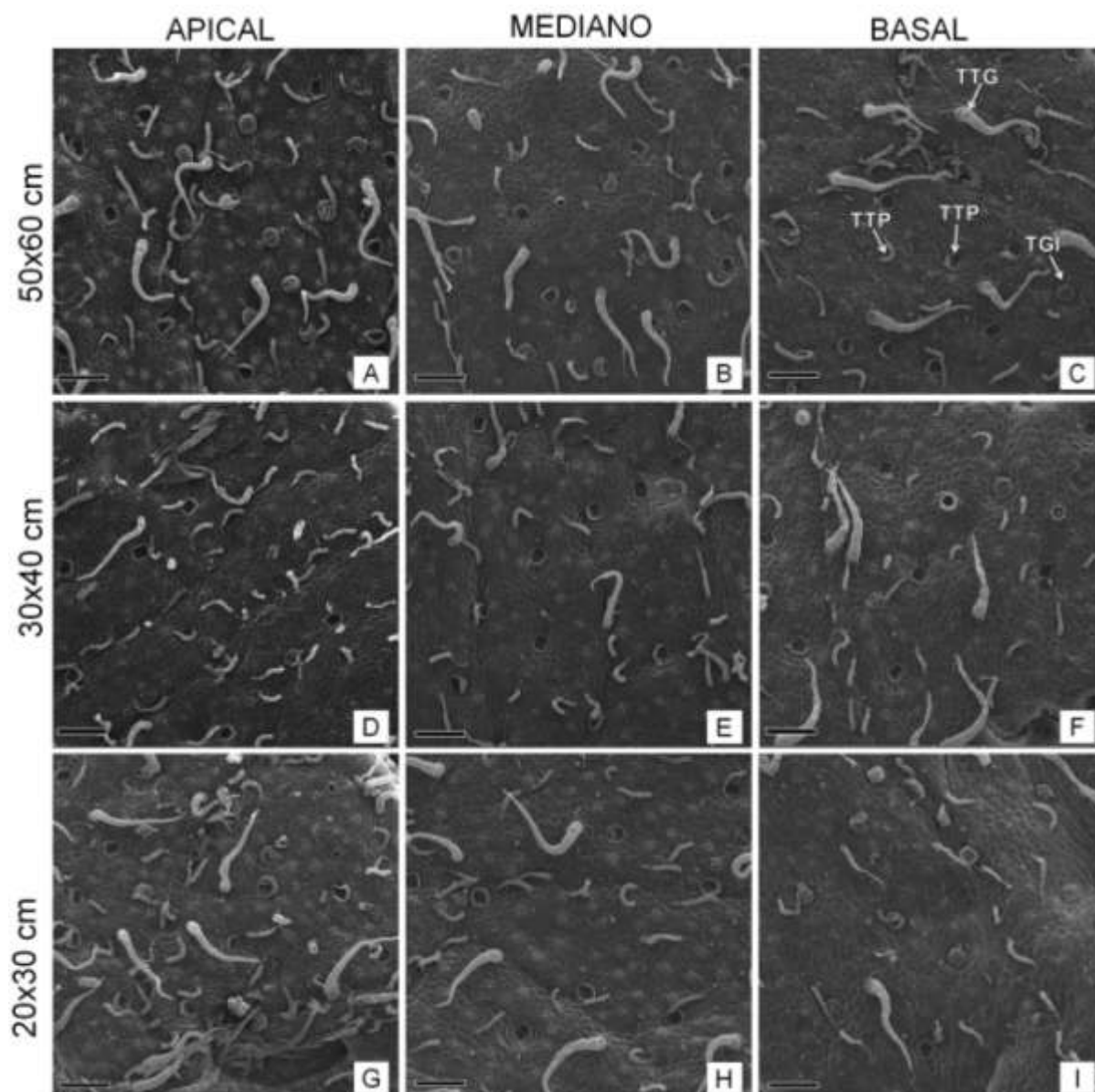
Considerando a menor incidência de radiação fotossinteticamente ativa na região mediana quando comparada à basal, é possível inferir que a diminuição relativa da espessura do parênquima paliçádico, bem como a maior proporção de espaços intercelulares, representam um mecanismo de diminuição da resistência à difusão de gases (CO<sub>2</sub>) no interior da folha, buscando aumentar a eficiência fotossintética na região basal (GOBBI *et al.*, 2011). Além das alterações no limbo foliar, mecanismos envolvendo alterações na epiderme também podem ser observadas em função da radiação.

Conforme relatado na literatura, na superfície foliar de estêvia são observados três tipos de estruturas epidérmicas: tricomas tectores grandes, tricomas tectores pequenos e tricomas glandulares (MONTEIRO *et al.*, 2001; BONDAREV *et al.*, 2010). Todas as estruturas foram também observadas no presente trabalho e são apresentadas na Figura 1.

Observou-se uma tendência de redução da densidade dos três tipos de tricomas à medida que a densidade de plantio foi maior (Figura 2). Este fato pode ser explicado pelo menor autossombreamento, e conseqüente maior exposição à luz nas plantas submetidas a espaçamentos menos adensados. Uma das maneiras das plantas adaptarem-se ao excesso de radiação é por meio do aumento da densidade de tricomas tectores na superfície foliar. Estas estruturas refletem a radiação, especialmente a infravermelha, que pode causar superaquecimento e danos no aparato fotossintético (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Na espécie aromática *Ocimum gratissimum* L., de maneira semelhante, verificou-se maior densidade de tricomas tectores e glandulares na face adaxial de folhas de plantas cultivadas a pleno sol em comparação com o cultivo sob malhas coloridas. Segundo os autores, os tricomas atuam como uma barreira mecânica contra a alta intensidade luminosa (MARTINS *et al.*, 2009). Ainda corroborando com

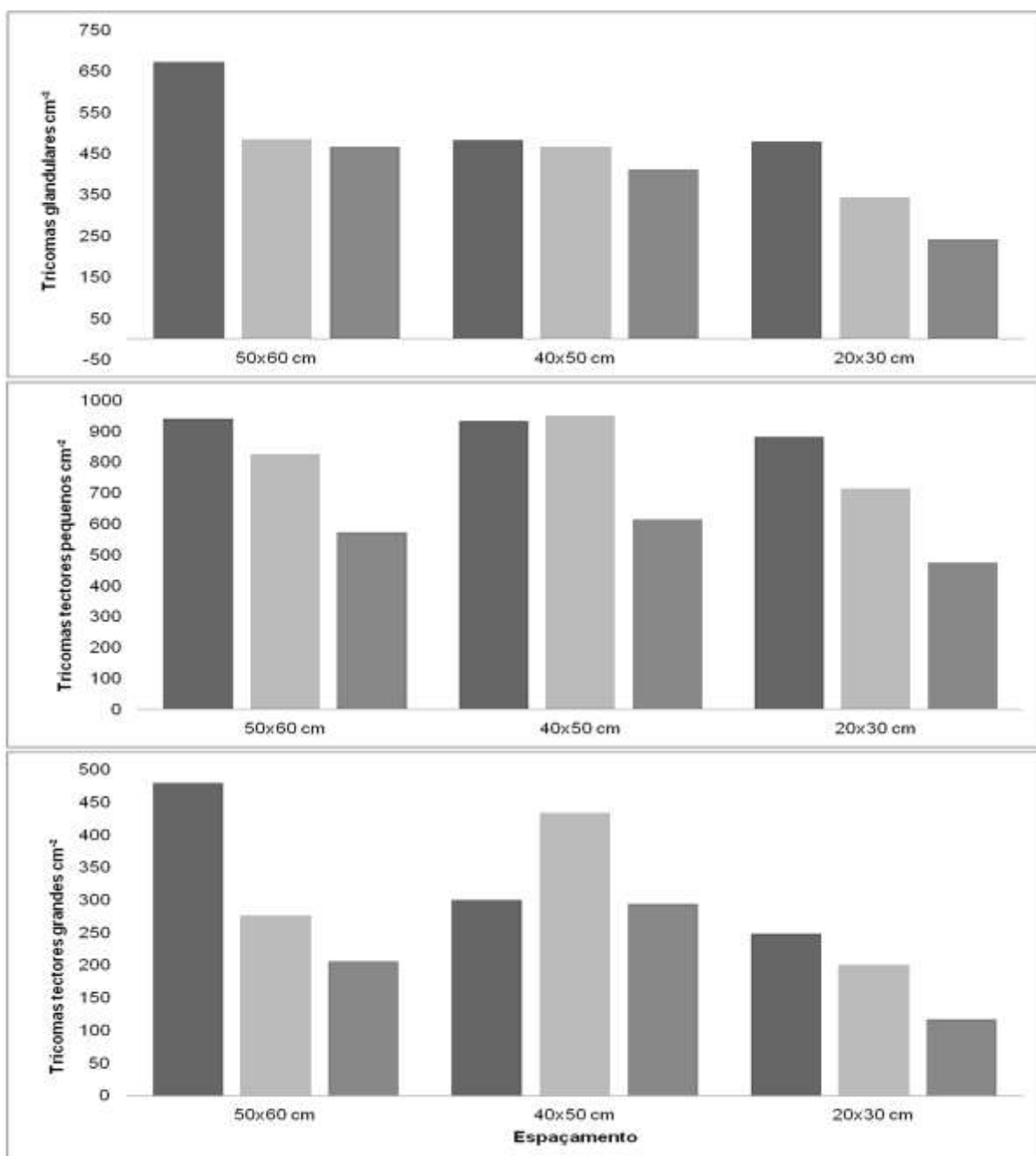
o presente trabalho, na espécie *Ocimum selloi* Benth. verificou-se maior densidade de tricomas glandulares nas duas faces foliares de plantas cultivadas a pleno sol (COSTA *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura da epiderme adaxial de folhas de diferentes segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos evidenciando a presença de tricomas. TTG: tricoma tector grande; TTP: tricoma tector pequeno; TGI: tricoma glandular intacto; TGD: tricoma glandular danificado. Barra: 200 µm.

Além da dissipação da radiação, a presença de tricomas glandulares também pode ser indicativo de um mecanismo de defesa bioquímico. Estudos colorimétricos revelaram a presença de sesquiterpenos, alcaloides e compostos fenólicos nos tricomas glandulares de estêvia (TATEO *et al.*, 2001). A presença de compostos

fenólicos cumpre função importante na proteção contra radiação UV-B, resultante da exposição aos raios solares (LIAKOURA *et al.* 1997). Plantas expostas à altos níveis de radiação são induzidas à mudanças bioquímicas, tais como a produção de compostos que absorvem UV-B, como flavonoides e outros compostos fenólicos. Estas moléculas reduzem significativamente o potencial da radiação em danificar o DNA das células (DAY, 1993; MAZZA *et al.* 2000; BOEGER e POULSON, 2006).



**Figura 2.** Densidade de tricomas tectores grandes, tricomas tectores pequenos e tricomas glandulares em segmentos apical (■), mediano (□) e basal (▒) de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. Média de duas repetições.

Quanto ao segmento da planta, foi observada uma tendência de decréscimo da densidade de tricomas tectores grandes, pequenos e glandulares a partir do segmento apical (Figura 2). Além do fato das folhas apicais receberem mais radiação, este segmento também contém maior número de folhas jovens não expandidas em relação aos segmentos mediano e basal, o que pode explicar a maior densidade de estruturas epidérmicas. Em *Mentha x piperita* L. var. piperita, Pegoraro *et al.* (2010) relatam maior densidade de tricomas em folhas jovens como consequência da expansão incompleta, fato também relatado em *Piper regnellii* (Miq.) C. DC , onde os tricomas recobrem toda a extensão das folhas jovens, formando uma cobertura densa em ambas as faces do limbo e à medida que o limbo se expande, a densidade diminui (SILVA e MACHADO, 1999).

Para estévia, o trabalho de Bondarev *et al.* (2010), corroborando com o presente, também demonstra maior densidade de tricomas nas folhas apicais em relação às basais. Segundo os autores, existe uma correlação entre a densidade de tricomas, especialmente glandulares, com a produção de glicosídeos diterpênicos, o que poderia indicar um papel destas estruturas na biossíntese e armazenamento dos compostos edulcorantes. Para Ceunen e Geuns (2013b), no entanto, apesar do acúmulo de alguns diterpenos em tricomas glandulares, não há nenhuma prova direta para a acumulação de glicosídeos de esteviol nestas estruturas.

A síntese e armazenamento de glicosídeos de esteviol é um processo complexo, ainda não totalmente elucidado, estando sujeito à diversas variações espaciais e temporais bem como mudanças no ambiente, assunto discutido no tópico seguinte.

#### 4.3.4 Teor e produtividade de glicosídeos de esteviol

Para as variáveis relacionadas ao teor e produtividade de glicosídeos diterpênicos a interação entre segmentos de planta e espaçamento foi significativa para o teor de rebaudiosídeo A e para a relação entre rebaudiosídeo A e esteviosídeo. Avaliando os fatores isoladamente, o espaçamento afetou significativamente os teores esteviosídeo, enquanto que o segmento de planta foi significativo para teor e produtividade de esteviosídeo e produtividade de rebaudiosídeo A (Anexo 8).

Maiores teores de rebaudiosídeo A foram observados na interação entre segmentos apical e mediano e o plantio menos adensado (50x60 cm). Apesar de valores próximos nos espaçamentos 20x30 e 50x60 cm, o segmento mediano apresentou teores de esteviosídeo 63% maiores que o apical no espaçamento 30 x 40 (Tabela 5).

**TABELA 5.** Médias de teores rebaudiosídeo A e relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. Pinhais/PR (2016).

<b>Rebaudiosídeo A (mg g<sup>-1</sup>)</b>				
Espaçamentos	Segmento de planta			Média
	<b>Apical</b>	<b>Mediano</b>	<b>Basal</b>	
<b>20x30 cm</b>	18,67 bA	18,30 bA	20,70 aA	19,11
<b>30x40 cm</b>	16,55 bB	27,09 abA	19,34 aAB	20,99
<b>50x60 cm</b>	35,59 aA	33,01 aA	16,85 aB	28,48
Média	23,60	26,13	18,96	
<b>Relação rebaudiosídeo A / esteviosídeo</b>				
Espaçamentos	Segmento de planta			Média
	<b>Apical</b>	<b>Mediano</b>	<b>Basal</b>	
<b>20x30 cm</b>	0,47 bAB	0,35 aB	0,54 aA	0,46
<b>30x40 cm</b>	0,47 bB	0,45 aB	0,61 aA	0,51
<b>50x60 cm</b>	0,66 aA	0,48 aB	0,38 bB	0,51
Média	0,56	0,43	0,51	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segmentos mediano e apical apresentaram maiores teores de rebaudiosídeo A quando submetidos a espaçamentos menos adensados. O segmento basal não apresentou alterações nesta variável em função dos espaçamentos. De maneira semelhante, os teores médios de esteviosídeo também foram maiores no plantio menos adensado (Tabela 6).

As produções mais elevadas de glicosídeos de esteviol por massa seca de folhas em cultivo menos adensado estão relacionadas com a menor competição das plantas por luz, água e nutrientes. É possível inferir que o melhor aproveitamento da radiação por indivíduo, considerando menor competição, promoveu maior acúmulo de precursores e energia para a biossíntese destas moléculas, uma vez que as duas moléculas precursoras da via de síntese de terpenos (gliceraldeído-3-fosfato e piruvato) derivam diretamente da fotossíntese ou da glicólise (BARBET-MASSIN *et al.*, 2015).

Melhor aproveitamento da radiação para a síntese de biomoléculas também pode ser uma maneira de compreender a interação positiva entre os segmentos apical e mediano (onde há maior radiação incidente, considerando o perfil da planta)

e o espaçamento menos adensado. Considerando que o rebaudiosídeo A difere do esteviosídeo pela adição de uma molécula de glicose no carbono 3 (GEUNS, 2003), pode-se inferir que disponibilidade de luz para a fotossíntese e produção de carboidratos seja um fator limitante.

A maior relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo se deu na interação entre o segmento apical e o espaçamento menos adensado, em função do incremento da produção de rebaudiosídeo A nestas condições e da menor produção de esteviosídeo no segmento apical em detrimento do terço mediano (Tabela 6).

**TABELA 6.** Médias de teores de esteviosídeo e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em segmentos de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos. Pinhais/PR (2016).

Espaçamentos	Variação	20x30 cm	30x40 cm	50x60cm
	Teor de esteviosídeo (mg g <sup>-1</sup> )	43,51 b	43,22 b	55,47 a
Espaçamentos	Produtividade de esteviosídeo (kg ha <sup>-1</sup> )	18,34 <sup>ns</sup>	14,22	13,80
	Produtividade de rebaudiosídeo A (kg ha <sup>-1</sup> )	8,01 <sup>ns</sup>	6,29	7,65
Segmentos de planta	Variação	Apical	Mediano	Basal
	Teor de esteviosídeo (mg g <sup>-1</sup> )	43,29 b	60,97 a	37,95 b
Segmentos de planta	Produtividade de esteviosídeo (kg ha <sup>-1</sup> )	22,47 a	18,22 a	5,67 b
	Produtividade de rebaudiosídeo A (kg ha <sup>-1</sup> )	11,63 a	7,40 b	2,91 c

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). <sup>ns</sup>: não significativo.

Considerando os dados de rebaudiosídeo A e esteviosídeo, é possível perceber, de modo geral, uma tendência de maior acúmulo de glicosídeos de esteviol (Rebaudiosídeo A + esteviosídeo) na região mediana da planta. Ponderando a relação proposta por Bondarev *et al.* (2010) sobre o armazenamento de glicosídeos em tricomas glandulares, os dados do presente experimento corroboram com a observação de Ceunen e Geuns (2013b), de que não há prova direta sobre este fato, uma vez que não foi observada relação entre a produção de compostos e a presença de estruturas epidérmicas.

Uma relação consensual, no entanto, é a do fotoperíodo com a produção dos compostos edulcorantes em *S. rebaudiana*. De modo geral, em plantas cultivadas em condições de dias longos (16 horas de luz) o conteúdo de glicosídeos é maior em folhas jovens em crescimento próximas ao ápice da planta e apresenta decréscimo constante em direção às folhas basais senescentes. No entanto, padrão diferente é observado em plantas em florescimento sob condições de dias curtos (8

horas de luz), apresentando maior acúmulo de glicosídeos de esteviol em folhas do terço mediano e níveis menores próximo do ápice e base da planta (CEUNEN e GEUNS, 2013a; 2013b).

Analizando o padrão de acúmulo de glicosídeos diterpênicos, especialmente esteviosídeo, nas plantas avaliadas no presente experimento, percebe-se distribuição semelhante ao relatado para plantas de dias curtos, com maior concentração no terço mediano. Este comportamento pode ser explicado em função da época de transplântio adotada, meados de novembro. O plantio nesta época expõe o cultivo precocemente à diminuição constante do fotoperíodo, iniciada no fim do mês de dezembro. Isto estimula o florescimento da cultura, que ocorre naturalmente entre janeiro e março no hemisfério sul (AHMED *et al.* 2011; YADAV *et al.*, 2011). Esta redução no ciclo pode afetar o padrão de transcrição de genes envolvidos na biossíntese dos compostos edulcorantes, afetando sua distribuição no perfil da planta.

Com efeito, as observações da literatura apontam para uma regulação transcricional da produção dos compostos ao longo do perfil da planta. Os maiores ou equivalentes teores de rebaudiosídeo A no segmento mediano (Tabela 5), mesmo em condição de menor disponibilidade de radiação do que no segmento apical, podem ser indicativos da limitação do fluxo metabólico desta molécula pela disponibilidade de esteviosídeo, produzido em maior quantidade no terço mediano.

A limitação da biossíntese de rebaudiosídeo A pela disponibilidade de esteviosídeo é inferida por Ceunen e Geuns (2013b) em experimento que avaliou a variação ontogenética da razão rebaudiosídeo A/ esteviosídeo em função de fotoperíodos. Evidência mais direta desta regulação por disponibilidade de substrato é reportada por Yang *et al.* (2015), que avaliaram a relação entre as flutuações transcricionais e as diminuições nos teores de glicosídeos diterpênicos após o florescimento em estêvia. Os autores verificaram que a expressão do gene *SrUGT76G1*, responsável pela síntese da enzima que catalisa a conversão de esteviosídeo para rebaudiosídeo A não sofreu alterações nos estádios de floração, enquanto que *SrUGT74G1* (responsável pela enzima que catalisa a biossíntese de esteviosídeo) mostrou maiores flutuações e maior expressão no período de máxima produção dos compostos de interesse.

Se parece claro o fato da síntese de rebaudiosídeo A ser fortemente influenciada pela disponibilidade de esteviosídeo, ainda não se explica quais são os

mecanismos regulatórios da produção de esteviosídeo e demais moléculas precursoras ao longo do perfil da planta.

Algumas evidências para estes mecanismos podem ser observadas no trabalho de Guleria e Yadav (2013). Em experimento com silenciamento genético os autores relataram que os genes *SrKA13H* e *SrUGT85C2* (correspondentes às enzimas hidroxilase do ácido caurenóico e glicosiltransferase dependente de UDP 85C2, envolvidas na síntese de moléculas de esteviol e esteviolmonosídeo, respectivamente) são os principais reguladores do fluxo de carbono entre glicosídeos de esteviol e giberelinas (GULERIA e YADAV, 2013). Todavia, é conveniente ressaltar que as giberelinas estão presentes em baixas concentrações nas plantas, concentrações cerca de 10mil vezes menores do que o observado para os glicosídeos diterpênicos (GEUNS, 2003). Desta maneira, a simples regulação do fluxo entre giberelinas e esteviol não é suficiente para explicar o acúmulo destes metabólitos em *S. rebaudiana*, tão pouco para elucidar os mecanismos de regulação ao longo do perfil da planta.

Neste sentido, o trabalho de Kumar *et al.* (2012) parece fornecer algumas evidências que podem explicar o comportamento observado no presente experimento. Os autores avaliaram a expressão de 15 genes em estêvia e sua correlação com a produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em folhas do primeiro ao quinto nó. Relatou-se que folhas na posição do terceiro nó (considerando a folha apical como a posição do primeiro nó) apresentou maior teor de substâncias edulcorantes, comportamento semelhante ao observado no presente trabalho. A expressão dos genes correspondentes às enzimas 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) e ent-kaurenoic acid oxidase (KO) mostrou correlação positiva com a produção dos compostos, sugerindo seu papel no controle do fluxo metabólico. Ausência de correlação entre o conteúdo de glicosídeos de esteviol e expressão dos demais genes no perfil da planta sugere que estes genes ou seus produtos podem não ser limitantes/regulatórios na distribuição espacial dos compostos na planta, como é observado em outras vias metabólicas, onde apenas alguns genes servem como reguladores (SINGH *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2012).

A despeito dos maiores teores de glicosídeos diterpênicos, a média das produtividades não apresentou diferenças entre os espaçamentos, uma vez que as menores produtividades individuais foram compensadas pelo maior número de plantas por unidade de área nos espaçamentos mais adensados (Tabela 6). De fato



são observados relatos na literatura nos quais as maiores densidades chegam até a superar as vantagens competitivas, atingindo produções superiores, conforme relatado por Serfaty *et al.* (2013) e por Kumar *et al.* (2014 a), que chegaram a registrar acréscimo de 114,8% no acúmulo de glicosídeos de esteviol na densidade de 111.111 plantas ha<sup>-1</sup> em comparação com a menor densidade avaliada (37.037 plantas ha<sup>-1</sup>).

#### 4.4 CONCLUSÕES

A produção de massa seca de folhas é favorecida pelo espaçamento de 50 x60 cm, todavia o maior número de plantas por área no espaçamento de 20x30 cm compensa as vantagens individuais atingindo maiores produtividades. O padrão de distribuição de biomassa no perfil do genótipo avaliado não é afetado pelo espaçamento, demonstrando que é peculiar ao material e pouco afetado pelas condições de radiação. A maior disponibilidade de luz no espaçamento menos adensado promove maiores teores de substâncias edulcorantes, não diferindo, entretanto, na sua produtividade.

Teores de rebaudiosídeo A e esteviosídeo não apresentam relação direta com as adaptações e caracteres anatômicos avaliados, exibindo padrão semelhante ao relado na literatura para outros genótipos.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

AHMED, B.; HOSSAIN, M.; ISLAM, R.; SAHA, A. K; MANDAL, A. A review on natural sweetener plant – Stevia having medicinal and commercial importance. **Agronomski Glasnik**, v 1. p. 75-92, 2011.

AGUILERA, D.B.; FERREIRA, F.A.; CECON, P.R.. Crescimento de *Siegesbeckia orientalis* sob diferentes condições de luminosidade. **Planta daninha**, v. 22, n. 1, p. 43-51, DOI: 10.1590/S0100-83582004000100006.

BARBET-MASSIN, C.; GIULIANO, S.; ALLETTO, L.; DAYDÉ, J.; BERGER, M. Nitrogen Limitation Alters Biomass Production but Enhances Steviol Glycoside Concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **PLoS One**, v.10, n.7, p. 1 – 16, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0133067.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.

BERLYN, G.P.; CHO, J. Light, moisture, and nutrient use by plants. In: ASHTON, M.S., MONTAGNINI, F. (Eds.) **The silvicultural basis for agroforestry systems**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p.9-39.

BERLYN, G.P.; MIKSCH, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.

BOEGER, M. R. T.; POULSON, M. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 329-338, 2006. DOI: 10.1590/S0102-33062006000200008.

BONDAREV, N.I.; SUKHANOVA, M.A.; RESHETNYAK, O.V.; NOSOV, A. M. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny, **Biologia Plantarum**, v. 47, n.2, p. 261–264, 2003. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000022261.35259.4f.

BONDAREV, N. I.; SUKHANOVA, M.A.; SEMENOVA, G.A.; GORYAEVAC, O. V.; ANDREEVAC, S.E.; NOSOV, A. M. Morphology and Ultrastructure of Trichomes of Intact and In Vitro Plants of *Stevia Rebaudiana* Bertoni with Reference to Biosynthesis and Accumulation of Steviol Glycosides. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 65, n.1, p. 12–16, 2010. DOI: 10.3103/S0096392510010037.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. Ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 2010. 904 p.

CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; SOARES, A.M.; MELO, H.C.; BERTALUCCI, S.K.V.; VIEIRA, C.V.; JÚNIOR, E.C.L. Adaptações anatômicas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae), em três regiões distintas da planta, em diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.2, p.8-16, 2007.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Plant Science**, v. 198, p. 72-82, 2013 a. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.10.003.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. **Journal of Natural Products**, v 76, n.6, p. 1201–1228, 2013 b. DOI: 10.1021/np400203b.

CHAGAS, J. H.; RIBEIRO, A. S.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; BOTREL, P. P.; COSTA, A. G. Análises foliares em plantas de *Mentha arvensis* L.

cultivada sob diferentes malhas e níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n.2, p. S3464 - S3471, 2010.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBCS/NRS, 2004. 400p.

COSTA, L. C. B.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; ALVES, E.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSAL, L. F.; MOREIRA, C. M. Aspectos da anatomia foliar de *Ocimum selloi* Benth.(Lamiaceae) em diferentes condições de qualidade de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 6 – 8, 2007.

DAY, T.A. Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. **Oecologia**, v. 95, n. 4, p. 542 – 550, 1993. DOI: 10.1007/BF00317439.

DESCHAMPS, F. C.; ALVES de BRITO, C. J. F. Qualidade da forragem e participação relativa na produção de matéria seca de diferentes frações de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1418 – 1423, 2001. DOI: 10.1590/S1516-35982001000600005.

FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. 2.ed. London: Van Nostrand, 1949. 1244p.

FRANCISCO, F. **Acúmulo de biomassa, produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A e tolerância à geada e ao acamamento de acessos de *Stevia rebaudiana* Bert.** 2015. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015.

GEUNS, J. Stevioside. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 913–921, 2003. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00426-6.

GOBBI, K.F.; GARCIA, R.; VENTRELLA, M. C.; GARCEZ NETO, A.F.; ROCHA, G.C. Área foliar específica e anatomia foliar quantitativa do capim-braquiária e do amendoim-forrageiro submetidos a sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 7, p. 1436-1444, 2011. DOI: 10.1590/S1516-35982011000700006.

GOTO, A.; CLEMENTE, E. Influência do rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n.1, p. 3 – 6, 1998.

GULERIA, P.; YADAV, S. K. *Agrobacterium* Mediated Transient Gene Silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: Insights into Steviol Glycoside Biosynthesis Pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1 – 10, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0074731.

JARMA, A. O.; CARRANZA, C. G.; CLAVIJO, J. P. Captación y uso de la radiación en plantas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en el Caribe colombiano. **Agronomía Colombiana**, v. 28, n. 1, p. 37-46, 2010.

JARMA, A. O.; RENGIFO, T.; ARAMÉNDIZ, H. Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. **Agronomía Colombiana**, v. 24, n. 1, p. 38-47, 2006.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 1940. 523 p.

KOLB, N.; HERRERA, J.L.; FERREYRA, D.J.; ULIANA, R.F. Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p 4538–4541, 2001.

KUMAR, H.; KAUL, K.; BAJPAI-GUPTA, S.; KAUL, V. K.; KUMAR, S. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Gene**, v. 492, n.1, p. 276-284, 2012. DOI: 10.1016/j.gene.2011.10.015.

KUMAR, R.; SHARMA, S.; SOOD, S. Yield components, light interception and marker compound accumulation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) affected by planting material and plant density under western Himalayan conditions. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n.12, p 1731–1745, 2014 a. DOI: 10.1080/03650340.2014.909029.

KUMAR, R.; SOOD, S.; SHARMA, S.; KASANA, R.C.; PATHANIA, V.L.; SINGH, B.; SINGH, R.D. Effect of plant spacing and organic mulch on growth, yield and quality of natural sweetener plant Stevia and soil fertility in western Himalayas. **International Journal of Plant Production**, v. 8, n. 3, p. 311-334, 2014b.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 2.ed. New York: Springer, 2008. 610p.

LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; AH-HEN, K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n.3, p 1121–1132, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140.

LIAKOURA, V.; STEFANOY, M.; MANETAS, Y.; CHOLEVAS, C. & KARABOURNIOTIS, G. Trichome density and its UV-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. **Environmental and Experimental Botany**, v. 38, n. 3, p. 223-229, 1997. DOI: 10.1016/S0098-8472(97)00005-1

LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. **Sistemas de Produção 5: Estévia**. Dourados: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste, 2004. 55p.

LOPES, N. F.; MAESTRI, M. Análise de crescimento e conversão de energia solar em milho (*Zea mays* L.) em Viçosa, Minas Gerais. **Ceres**, v. 20, n. 109, p. 189 – 201, 1973.

LOPES, W. A. R.; NEGREIROS, M. Z.; DOMBROSKI, J. L. D.; RODRIGUES, G. S. O.; SOARES, A. M.; ARAÚJO, A. P. Análise do crescimento de tomate ‘SM-16’ cultivado sob diferentes coberturas de solo. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 554-561, 2011. DOI: 10.1590/S0102-05362011000400019.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T. POSSO, D. A.; AUMONDE, T. Z.; BACARIN, M. A. Análise de crescimento e partição de assimilados em plantas de tomateiro cv. Micro-Tom submetidas ao nitrogênio e piraclostrobina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 5, p. 3001 – 3012, 2015. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n5p3001.

MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SILVA, A. P. O.; OLIVEIRA, C.; ALVES, E. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 82 – 87, 2009 DOI: 10.1590/S0103-84782008005000040.

MARTINS, J.R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, A. P. O. Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, p. 102-107, 2008.

MAZZA, C. A.; BOCCALANDRO, H. E.; GIORDANO, C. V.; BATTISTA, D.; SCOPEL A. L.; BALLARÉ, C. L. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. **Plant Physiology**, v. 122, n.1, p. 117 – 125, 2000. DOI: 10.1104/pp.122.1.117

MISHRA, P.; SINGH R.; KUMAR U.; PRAKASH V. *Stevia rebaudiana* – A magical sweetener. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 5, n.1, p. 62–74, 2010.

MONTEIRO, W. R.; CASTRO, M. M.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C.; MAHLBERG, P. G. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. - Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 3, p. 349-357, 2001. DOI: 10.1590/S0100-84042001000300013.

OLIVEIRA, M. A.; PEREIRA, O. G.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M.; GARCIA, R.; CECON, P.R. Análise de crescimento do capim-bermuda “Tifton 85” (*Cynodon* spp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1930-1938, 2000.

PEGORARO, R. L.; FALKENBERG, M. B.; VOLTOLINI, C. H.; SANTOS, M.; PAULILO, M. T. S. Produção de óleos essenciais em plantas de *Mentha x piperita* L. var. piperita (Lamiaceae) submetidas a diferentes níveis de luz e nutrição do substrato. **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, n. 4, p. 631-637, DOI: 10.1590/S0100-84042010000400011.

POORTER, H.; GARNIER, E. Ecological significance of inherent variation in relative growth rate and its components. *In*: Pugnaire, F.I.; VALLADARES, F. (Eds). **Handbook of functional plant**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.81–120.

RAFFO, M. ; IGLESIAS, D. Efecto de la intercepción y distribución de la radiación fotosintéticamente activa en manzanos cv. Fuji', bajo cuatro sistemas de conducción en alta densidad. **Revista de Investigaciones Agropecuarias** v.33, n.2, p. 29 – 42, 2004.

SERFATY, M.; IBDAH, M.; FISCHER, R.; CHAIMOVITSH, D.; SARANGA, Y.; DUDAI, N. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and Harvesting regimes. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 731-736, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.08.063.

SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 117-124, 1999.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Comparison of means of agricultural experimentation data through different tests using the software Assistat. *African Journal of Agricultural Research*, Lagos, v.37, n. 11, p.3527-3531, 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11523.

SINGH, K.; RANI, A.; KUMAR, S.; SOOD, P.; MAHAJAN, M.; YADAV, S.K.; SINGH, B. AHUJA, P.S. An early gene of the flavonoid pathway, flavanone 3-hydroxylase, exhibits a positive relationship with the concentration of catechins in tea (*Camellia sinensis*). **Tree Physiology**, v. 28, n. 9, p. 1349 – 1356, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TATEO, F.; BONONI, M.; MARIOTTI, M. G. CORNARA, L.; SERRATO-VALENTI, G. Trichomes on vegetative and reproductive organs of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae). Structure and secretory products. **Plant Biosystems**, v. 135, n.1, p. 25–37, 2001. DOI: 10.1080/11263500112331350610.

WATSON, D.J. Comparative physiological studies on growth of field crops. I. Variation in net assimilation rate and leaf area between species and varieties, and within and between years. **Annals of Botany**, v.11, n. 1, p. 41-76, 1947.

WÖLWER-RIECK, U. The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 886–895, 2012. DOI: 10.1021/jf2044907.

YADAV, A. K.; SINGH, S.; DHYANI, D.; AHUJA, P. S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, v 91, n.1, p. 1–27, 2011. DOI: 10.4141/cjps10086.

YANG, Y.; HUANG, S.; HAN, Y.; YUAN, H.; GU, C.; WANG, Z. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.86, p.174-180, 2015. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.12.004.

## 5 ASPECTOS NUTRICIONAIS EM FOLHAS E RAMOS DE *Stevia rebaudiana* EM FUNÇÃO DE DOSES DE FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

### RESUMO

*Stevia rebaudiana* é uma espécie vegetal de interesse agrícola pela produção de substâncias edulcorantes utilizadas em diversos países. Considerando o interesse econômico são necessários estudos no sentido de avaliar como os diferentes fertilizantes afetam a dinâmica nutricional na espécie. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o teor, conteúdo, partição e eficiência de utilização de macronutrientes na parte aérea de um genótipo de *Stevia rebaudiana* submetido a diferentes doses de fertilizante de liberação controlada. O experimento foi conduzido em vasos, em casa de vegetação e avaliou a dinâmica nutricional das plantas quando submetidas à doses de 0; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 mg dm<sup>-3</sup> de fertilizante de liberação controlada, incorporado ao solo. O fertilizante utilizado foi o produto comercial Basacote<sup>®</sup> Mini 6M, que contém macro e micronutrientes encapsulados por um polímero, realizando a liberação controlada destes nutrientes por seis meses. As doses foram comparadas por meio de análise de regressão. Os teores de macronutrientes em estévia são maiores nas folhas em comparação aos ramos, exceto para o potássio. A aplicação do fertilizante de liberação controlada afetou a ordem de acúmulo de nutrientes na parte aérea da espécie, em doses mais elevadas a ordem foi K>N>Ca>Mg>P, com aumento expressivo no acúmulo de potássio, que chegou a atingir concentrações duas vezes maiores que o nitrogênio. O teor médio de nitrogênio nas folhas foi de 23,68 g kg<sup>-1</sup>. A similaridade nas respostas, especialmente entre magnésio e fósforo, evidenciam um efeito de sinergismo. A diminuição na eficiência de utilização de cálcio e potássio em doses mais elevadas está relacionada ao aumento em seus conteúdos foliares e leve decréscimo no acúmulo de biomassa nessas condições. A redução da produção de biomassa e dos conteúdos de fósforo, magnésio e nitrogênio nas folhas em doses mais elevadas do fertilizante de liberação controlada possui relação direta com o aumento dos conteúdos de cálcio e potássio que podem ser antagônicos ao magnésio, amônio e alguns micronutrientes.

**Palavras-chave:** Basacote<sup>®</sup>, eficiência de utilização de nutrientes, partição de nutrientes, nutrição de estévia.



## NUTRITIONAL ASPECTS ON LEAVES AND BRANCHES OF *Stevia rebaudiana* Bertoni ACCORDING TO CONTROLLED RELEASE FERTILIZER DOSES

### ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* is a plant species with agricultural interest due to the production of sweetening substances used in several countries. Considering the economic interest, research is needed to evaluate how the different fertilizers affect the nutritional dynamics of the species. The objective of this research was to evaluate the content, accumulation, partitioning, and efficiency of macronutrients utilization in the shoots of a *Stevia rebaudiana* genotype submitted to different doses of controlled release fertilizer. The experiment was conducted in plastic pots, under greenhouse conditions and evaluated the nutritional dynamics of plants when submitted to doses of 0; 62.5; 125; 250; 500 and 1000 mg dm<sup>-3</sup> of slow-release fertilizer, incorporated into the soil. The applied fertilizer was the commercial product Basacote<sup>®</sup> Mini 6M, which contains macro and micronutrients encapsulated by a polymer, carrying out controlled release of these nutrients for six months. The doses were compared by polynomial regression analysis. Macronutrient concentration in stevia leaves is higher than concentration in branches, except for potassium. The application of the controlled release fertilizer affected the order of nutrient accumulation in the shoots of the species, at higher doses the order was K > N > Ca > Mg > P, with an expressive increase in the accumulation of potassium, reaching concentrations twice as large as nitrogen. The average nitrogen content in leaves was 23.68 g kg<sup>-1</sup>. The similarity in the responses, especially between magnesium and phosphorus, evidences an effect of synergism. The decrease in the calcium and potassium efficiency of utilization in higher doses is related to the increase on its leaf contents and slight decrease of biomass accumulation under these conditions. The decrease of biomass production and phosphorus, magnesium and nitrogen content in leaves at higher doses of the controlled release fertilizer is directly related to the increase in calcium and potassium contents, that may be antagonistic to magnesium, ammonium and some micronutrients.

**Key words:** Basacote<sup>®</sup>, nutrient utilization efficiency, nutrient partitioning, stevia nutrition.

## 5.1 INTRODUÇÃO

*Stevia rebaudiana* Bertoni é um subarbusto herbáceo pertencente à família Asteraceae. Nativa do nordeste do Paraguai, a planta também ocorre naturalmente em regiões vizinhas pertencentes ao território brasileiro e argentino. Atualmente, devido ao crescente interesse comercial, o cultivo da espécie tem se espalhado para outras partes do mundo, incluindo Canadá e algumas partes da Europa e Ásia (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

O valor econômico desta espécie é atribuído ao alto teor de glicosídeos diterpênicos em suas folhas. Estas substâncias, também conhecidas como glicosídeos de esteviol, possuem elevado potencial edulcorante e são desprovidas de valor calórico. Já foram identificados mais 30 glicosídeos de esteviol em concentrações variáveis na planta, destes, os de valor comercial mais elevado, esteviosídeo e rebaudiosídeo A, já são aprovados como aditivos alimentares em diversos países (WÖLWER-RIECK, 2012).

O conteúdo de glicosídeos diterpênicos, especialmente de esteviosídeo, é positivamente correlacionado com a biomassa de folhas (METIVIER e VIANA, 1979), que, por sua vez, depende de práticas agrícolas como a aplicação de fertilizantes (MANDAL *et al.*, 2013). Dessa maneira, são necessários estudos no sentido de avaliar como os diferentes fertilizantes afetam a dinâmica nutricional na espécie, visando melhor aproveitamento de recursos e respostas produtivas. Dentre as variáveis de importância na compreensão desta dinâmica destacam-se o teor, conteúdo, partição e eficiência de utilização de nutrientes.

O crescimento das plantas e sua exigência nutricional variam de acordo com a espécie e cultivar, dependendo da sua eficiência de absorção, de translocação e de utilização dos nutrientes (POZZA *et al.*, 2009). A eficiência de utilização, por sua vez, é função do transporte de nutrientes para a parte aérea e de sua exigência metabólica, sendo obtida pelo quociente entre a biomassa total da planta e a concentração do nutriente (SIDDIQI e GLASS, 1981). O estudo das diferenças na eficiência de utilização é importante na seleção de técnicas de manejo do solo para garantir a melhor capacidade produtiva (TEIXEIRA *et al.*, 1989).

O conhecimento dos teores e conteúdos de nutrientes em vários órgãos do vegetal permite realizar inferências sobre as exigências metabólicas de cada

compartimento, fornecendo base para o entendimento dessas variações e suas implicações nas respostas dos vegetais (AMARAL *et al.*, 2011).

Além da compreensão dos mecanismos nutricionais, a utilização de diferentes tecnologias para a disponibilização de nutrientes também pode promover incrementos na produtividade. Dentre estas tecnologias, a utilização de fertilizantes revestidos com polímeros, conhecidos como fertilizantes de liberação lenta ou fertilizantes de liberação controlada, tendem a apresentar maior eficiência em relação ao emprego de fertilizantes solúveis comuns. Esta maior eficiência é atribuída à estrutura dos grânulos revestidos com polímeros, que, ao absorverem água do solo, solubilizam os nutrientes no interior das cápsulas, e gradativamente os liberam por meio de estrutura porosa na zona da raiz (GUARESCHI *et al.*, 2011). Este mecanismo confere menores perdas de nutrientes por lixiviação, volatilização e fixação, possibilitando reduzir a dose aplicada (ZAHRANI, 2000).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o teor, conteúdo, partição e eficiência de utilização de macronutrientes na parte aérea de um genótipo de *Stevia rebaudiana* submetido a diferentes doses de fertilizante de liberação controlada, visando subsidiar a utilização desta tecnologia para o cultivo da espécie.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Localização, instalação e condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, situado a 25°25'40" S e 49°16'23" O, a uma altitude de 934 m, na cidade de Curitiba/PR. O clima da região, segundo classificação de Köppen, é Cfb temperado úmido com verão ameno, inverno frio e seco, chuvas uniformemente distribuídas durante o ano e ocorrência de geadas severas frequentes (KÖPPEN, 1931).

A instalação ocorreu no dia 24 de fevereiro de 2016. Muda de 15 a 20 cm de altura foram transplantadas em vasos plásticos com volume de 5,6 litros contendo solo peneirado. As propriedades químicas do solo utilizado como substrato são apresentadas na tabela 1. Os vasos contendo o solo e as doses de fertilizante de

liberação controlada correspondentes aos tratamentos foram dispostos aleatoriamente sobre bancadas.

**Tabela 1.** Análise química do solo utilizado no experimento. Curitiba/2016.

		Parâmetros químicos									
pH		Al <sup>+3</sup>	H <sup>+</sup> +Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	SB	T	P	C	V
CaCl <sub>2</sub>	SMP	----- cmol/dm <sup>3</sup> -----							mg/dm <sup>3</sup>	g/dm <sup>3</sup>	%
4,7	5,3	1,9	8,4	2,6	1,50	0,1	4,20	12,6	3,2	16,7	33

Conforme interpretação da análise de solo e recomendação do manual de adubação e calagem para os estados do Rio grande do Sul e Santa Catarina (CQFS-RS/SC, 2004), realizou-se a aplicação de 3750 mg dm<sup>-3</sup> de calcário Filler (PRNT 100%), equivalente a 7,5 toneladas por hectare, considerando a profundidade útil de 20 cm do solo. O corretivo foi incorporado ao solo de forma manual. Em função da aplicação do fertilizante de liberação controlada nos tratamentos, correções nos teores de nitrogênio, fósforo e potássio do solo não foram realizadas.

A irrigação do experimento foi realizada manualmente, com frequência diária. O controle das ervas daninhas foi realizado semanalmente também de forma manual. A colheita foi realizada 100 dias após o transplântio, ocasião em que as plantas estavam no início do florescimento.

### 5.2.2 Material vegetal e produção de mudas

O material vegetal e a produção de mudas utilizados no presente experimento são os mesmos descritos no item 3.2.2, página 50 a 51.

### 5.2.3 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos, quatro repetições e 8 plantas por parcela. Os tratamentos consistiram em doses de fertilizante de liberação controlada, correspondentes a 0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 mg dm<sup>-3</sup>, misturadas ao volume de solo dos vasos. Utilizou-se fertilizante de liberação controlada fabricado pela empresa Compo GmbH & Co. KG (Alemanha), de marca comercial Basacote<sup>®</sup> Mini 6M, cuja formulação é caracterizada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição química do fertilizante de liberação controlada Basacote® Mini 6M.

Macronutrientes (%)						
Nitrogênio			Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Potássio (K <sub>2</sub> O)	Magnésio (MgO)	Enxofre (S)
Total	Nítrico (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Amoniacal (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )				
13	5	8	6	16	1,4	10
Micronutrientes (%)						
Ferro (Fe)	Boro (B)	Zinco (Zn)	Cobre (Cu)	Manganês (Mn)	Molibdênio (Mo)	Diâmetro do grânulo (mm)
0,26	0,02	0,02	0,05	0,06	0,015	1,0 - 2,5

Fonte: Compo Expert, 2015.

O Basacote® Mini 6M, é um produto oriundo do encapsulamento de grânulos de fertilizantes solúveis com um polímero elástico chamado Poligen®. O tempo em que o produto segue liberando nutrientes para o solo é de 6 meses (COMPO EXPERT, 2015).

#### 5.2.4 Colheita e determinação de biomassa

As plantas foram colhidas com corte a 5 cm do solo. As folhas foram separadas manualmente dos caules. Após a separação o material devidamente identificado foi armazenado em sacos de papel multifoliado Kraft®, permanecendo em secador com circulação de ar forçado a 65 °C até peso constante para determinação da massa seca de folhas e massa seca da parte aérea.

#### 5.2.5 Análises Nutricionais

Após a secagem, amostras de folhas e caules foram encaminhados para as análises nutricionais. Para a análise dos teores de nitrogênio foram pesadas 20 mg de amostras de folha e 20 mg de amostras de ramos. As mesmas foram acondicionadas em cápsulas de estanho para posterior combustão seca em analisador elem elementar modelo Vario EL III® (método de Dumas ou análise elementar).

Para a determinação dos teores de P, K, Ca e Mg, foram pesadas 1 g de amostra em cadinhos de porcelana para incineração em mufla a 500 °C e subsequente digestão ácida com HCl a 3 mol L<sup>-1</sup> (MARTINS e REISSMANN, 2007).

Os teores foram determinados por espectrofotometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Varian 720-ES). As análises foram realizadas nos Laboratórios de Biogeoquímica e de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Paraná.

Com os dados dos teores de nutrientes e da biomassa seca de folhas e ramos, obteve-se o conteúdo (teor x biomassa). A eficiência de utilização de nutrientes nas folhas foi calculada através da equação:  $(\text{matéria seca produzida})^2 \times (\text{unidade do nutriente absorvido})^{-1}$  (SIDDIQI e GLASS, 1981). A opção pelo cálculo do índice de eficiência apenas nas folhas se deu em função destes órgãos serem o produto com valor comercial nos cultivos de estévia.

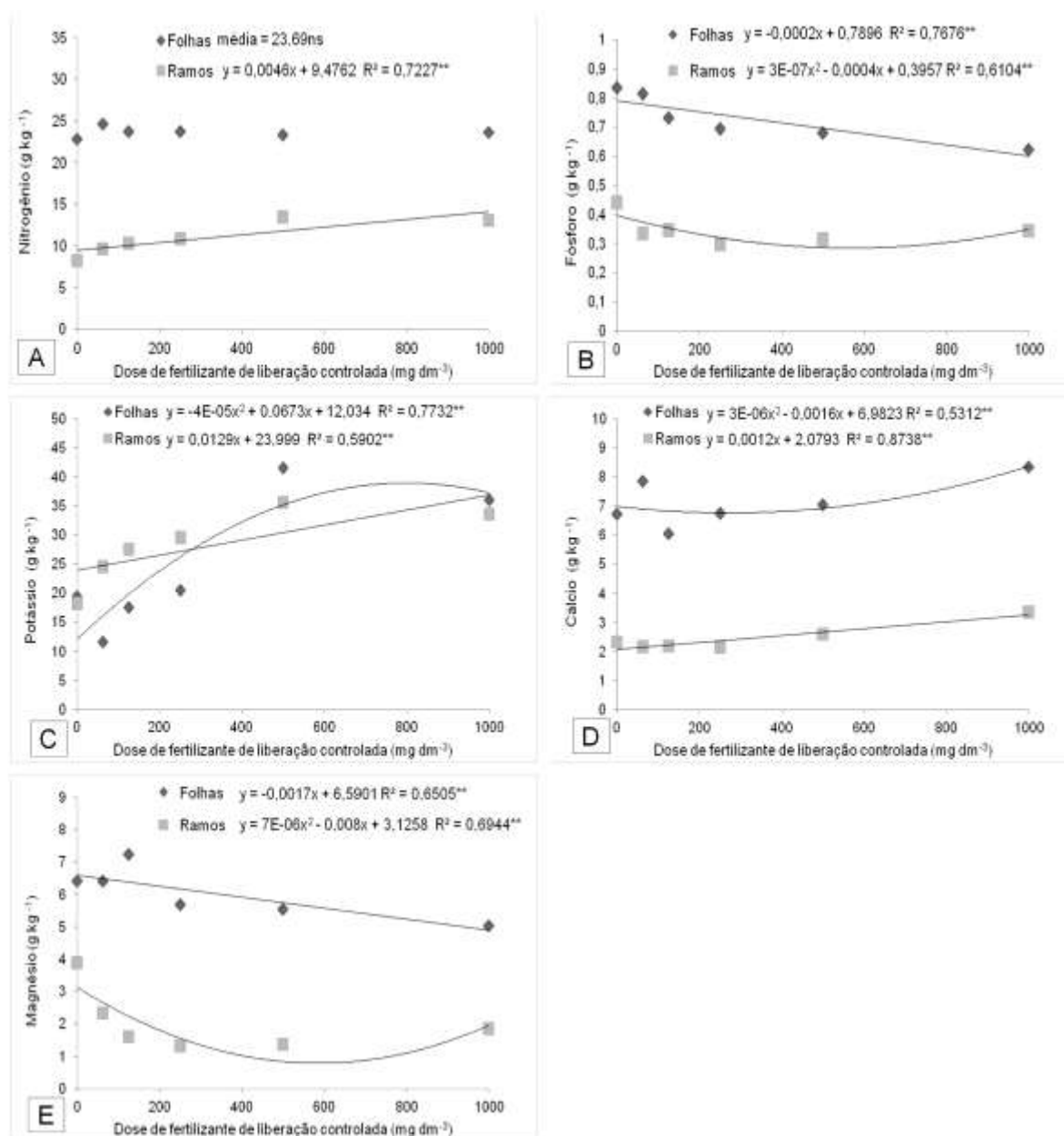
#### 5.2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para avaliação da homogeneidade das variâncias e à análise de variância ANOVA. As doses foram comparadas por meio de análise de regressão. O critério para a escolha do modelo foi a significância pelo teste F a 5% de probabilidade de erro, considerando os maiores valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Utilizou-se o programa estatístico ASSISTAT® (SILVA e AZEVEDO, 2016).

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1 Teor, conteúdo e partição de nutrientes na parte aérea

As doses de fertilizante de liberação controlada influenciaram estatisticamente o teor e conteúdo de todos os nutrientes avaliados, exceto teor de nitrogênio nas folhas e acúmulo de magnésio nos ramos (Figuras 1 e 2). Apesar de o teor de nitrogênio nas folhas não ter sido influenciado pelas doses do fertilizante de liberação controlada, o conteúdo apresentou resposta quadrática, acompanhando os incrementos na biomassa (dados não apresentados). A relação entre o conteúdo de nitrogênio e a biomassa se dá em função deste nutriente ser constituinte de diversos componentes da célula vegetal, incluindo aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, levando-o a ser o elemento mineral exigido em maior quantidade pelas plantas (TAIZ e ZEIGER, 2013).



**Figura 1.** Teores de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio (C), cálcio (D) e magnésio (E) em folhas e ramos de *Stevia rebaudiana* Bertoni em função de doses de fertilizante de liberação controlada.

Com relação à partição de nitrogênio na parte aérea, teor e conteúdo foram superiores nas folhas em relação aos caules, independente da dose utilizada. O teor médio de nitrogênio nas folhas foi de  $23,68 \text{ g kg}^{-1}$ . Para os ramos o teor máximo de nitrogênio foi de  $13,5 \text{ g kg}^{-1}$ , apresentando resposta linear positiva às doses do fertilizante (Figura 1A). O conteúdo nos ramos variou entre 21,1 e  $110,8 \text{ mg planta}^{-1}$ , também com resposta linear positiva, enquanto que o conteúdo nas folhas variou atingiu um máximo de  $203,5 \text{ mg planta}^{-1}$  com resposta quadrática (Figura 2A).

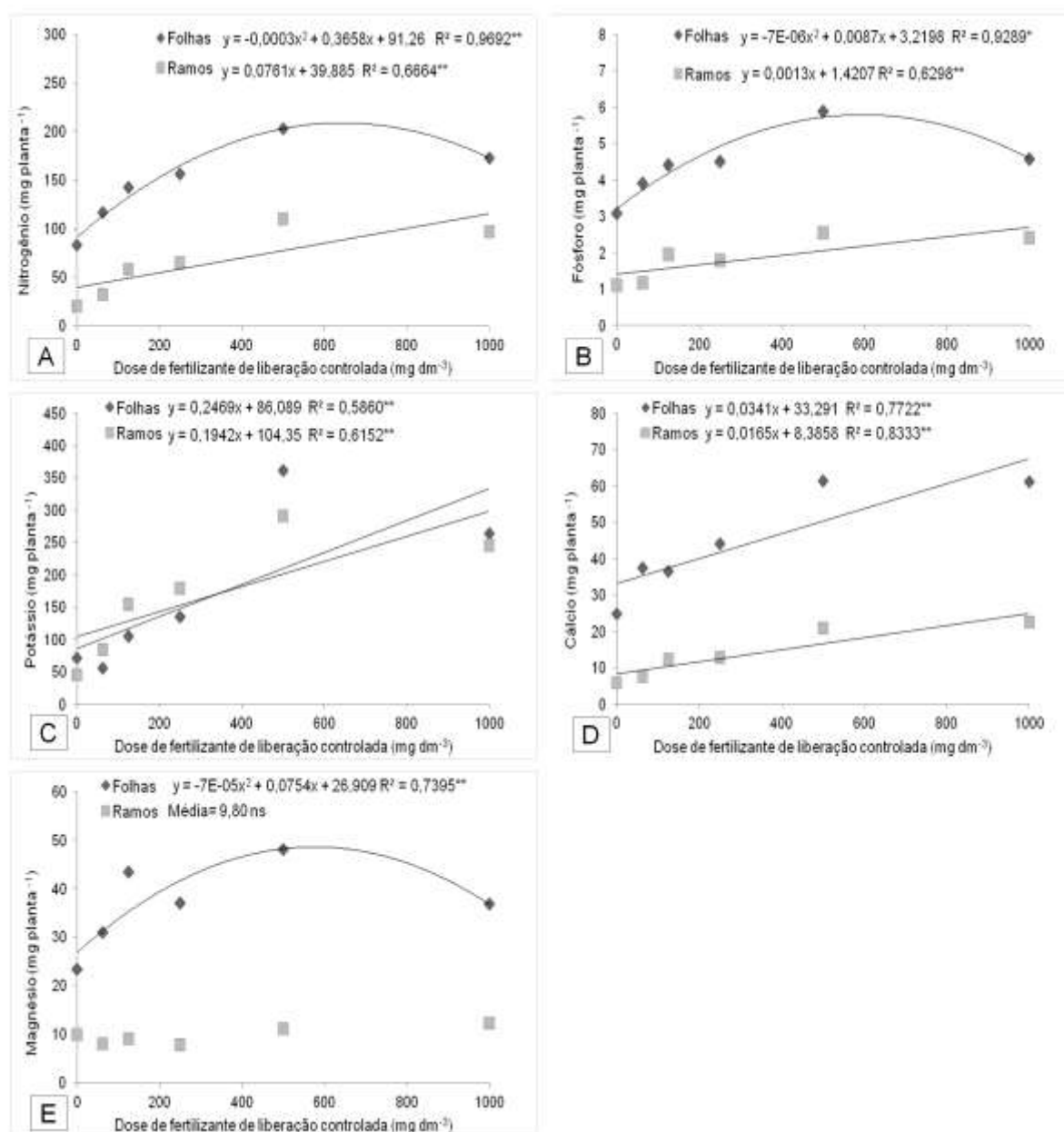
Em avaliação da dinâmica nutricional da espécie ao longo do ciclo, Lima-Filho *et al.* (1997), relatam valores similares para os teores de nitrogênio (35 e 15 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente para folhas e ramos) aos 30 dias após o transplântio, ocasião em que a cultura apresentava-se no início do florescimento. Apesar de teores semelhantes, o conteúdo relatado foi notoriamente diferente do observado nesta pesquisa (59 e 27,8 mg planta<sup>-1</sup>, para folhas e ramos) (LIMA-FILHO *et al.*, 1997). Estas diferenças no conteúdo estão relacionadas ao maior acúmulo de biomassa observada no presente experimento em função do tempo superior até a fase de início de florescimento e, possivelmente, a efeitos positivos do fertilizante de liberação controlada. Apesar das diferenças observadas, os autores também relatam maiores teores e conteúdos de nitrogênio nas folhas em relação aos ramos.

Os maiores teores e conteúdos de nitrogênio nas folhas em relação a outros órgãos estão possivelmente relacionados à utilização deste nutriente no processo fotossintético. De fato, estima-se que 50 a 70% do N total da folha seja integrante de enzimas ou moléculas associadas aos cloroplastos (CHAPMAN e BARRETO, 1997). Além da participação na estrutura da molécula de clorofila, o nitrogênio exerce influência na resistência difusiva do CO<sub>2</sub>, por meio de alterações na resistência do mesófilo e na resistência estomática. É fundamental também para a síntese e atividade da ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco), influenciando a taxa fotossintética, e, conseqüentemente, o desenvolvimento e produtividade das culturas (SORATTO *et al.*, 2004).

Outro elemento importante para a produtividade de cultivos é o fósforo, componente de moléculas de ATP, NADPH e ácidos nucleicos, entre outros compostos. Os teores máximos de fósforo nos ramos e folhas foram de 0,44 e 0,83 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. O teor de fósforo nas folhas diminuiu com o aumento das doses de fertilizante de liberação controlada (Figura 1B), resposta similar à observada para os teores de magnésio nas folhas (Figura 1E). As respostas dos teores de fósforo e magnésio nos ramos de estêvia em função das doses do fertilizante foram também semelhantes, quadráticas negativas.

A similaridade na resposta para os teores de magnésio e fósforo pode ser explicada pelo conhecido sinergismo entre os elementos no metabolismo vegetal. A absorção de fósforo é máxima quando na presença de magnésio, por se tratar de um carregador de P, como resultado de sua participação na ativação de ATPases da membrana, responsáveis pela absorção iônica (MALAVOLTA, 2006).





**Figura 2.** Conteúdo de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio (C), cálcio (D) e magnésio (E) em folhas e ramos de *Stevia rebaudiana* Bertoni em função de doses de fertilizante de liberação controlada.

Apesar dos teores se apresentarem inversamente proporcionais às doses do fertilizante de liberação controlada, os conteúdos de fósforo e magnésio nas folhas apresentaram respostas quadráticas (Figura 2 B, E). Este fato ilustra um provável efeito de diluição, no qual um significativo aumento de biomassa fez com que houvesse diminuição nas concentrações de P e Mg. Efeito similar foi reportado por Rossa *et al.* (2015) para o elemento P em tecidos foliares de mudas de *Eucalyptus grandis* submetidas a diferentes doses de basacote<sup>®</sup>.

De maneira semelhante ao observado para o nitrogênio, teores e conteúdos de fósforo e magnésio foram maiores nas folhas. A explicação para este fato também se dá em função da fotossíntese. O magnésio e fósforo são especialmente empregados nas reações de fotofosforilação (como a formação de ATP nos cloroplastos), fixação fotossintética do CO<sub>2</sub>, carboxilação/regeneração de RuBP, e formação de clorofila, processos que ocorrem em maior intensidade nos tecidos foliares (CAKMAK e YAZICI, 2010). Ainda nos tecidos foliares, fósforo e magnésio participam de reações que levam à formação de isopentenildifosfato (IPP), primeiro composto isoprenoide na síntese de glicosídeos de esteviol em *Stevia rebaudiana* (JARMA *et al.*, 2010).

Além da interação com o fósforo, o magnésio também é conhecido pela sua relação antagônica com o cálcio (MOORE *et al.*, 1961; MOREIRA *et al.*, 1999). Como observas-se na figura 1D, os teores foliares de cálcio observados no presente trabalho apresentaram resposta quadrática negativa às doses crescentes do fertilizante de liberação controlada, com expressivo aumento nas doses de 500 e 1000mg dm<sup>-3</sup>, onde houve redução do teor de Mg.

O antagonismo entre Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> está relacionado ao fato de apresentarem propriedades químicas muito similares, como o grau de valência e a mobilidade, fazendo com que haja competição pelos sítios de adsorção no solo e na absorção pelas raízes. A interação destes macronutrientes no sistema solo-planta é medida pela sua absorção pela planta, sendo a análise dos teores foliares o método mais utilizado para seu estudo (ORLANDO FILHO *et al.*, 1996; SCHERER, 1998; SALVADOR *et al.*, 2011).

O conteúdo de cálcio em folhas e ramos aumentou em relação às doses do fertilizante de liberação controlada (Figura 2 D). Este incremento no acúmulo de cálcio deve estar relacionado indiretamente aos efeitos do fertilizante de liberação controlada utilizado, uma vez que o mesmo não possui cálcio em sua composição (Tabela 2). Uma possível explicação é o fato de que o incremento da biomassa das plantas em função das doses tenha provocado aumento proporcional da atividade meristemática das raízes, aumentando a superfície de áreas mais jovens, uma vez que a absorção de Ca ocorre apenas em áreas radiculares ainda não suberizadas (QUAGGIO, 2000). De fato, devido à falta de mobilidade deste nutriente no solo, a absorção por interceptação radicular é um mecanismo importante (MALAVOLTA *et*

*al.*, 1997) e, possivelmente, potencializado pelo aumento na superfície de contato das raízes em função dos efeitos do fertilizante.

É conveniente ressaltar que mesmo no tratamento controle, sem aplicação do fertilizante, o teor de cálcio ( $6,71 \text{ g kg}^{-1}$ ) foi suficiente para o desenvolvimento normal das plantas, possivelmente devido à calagem realizada conforme recomendação para a cultura. Sintomas pronunciados de deficiência em estévia ocorreram com teores em torno de  $2,0 \text{ g kg}^{-1}$  de Ca nas folhas (LIMA-FILHO e MALAVOLTA, 1997).

O cálcio é um macronutriente vegetal que desempenha função bioquímica importante e favorece numerosos processos metabólicos, como a formação da parede celular, regulação da funcionalidade da membrana celular, constituição da lamela média, além de ativar vários sistemas enzimáticos, contribuindo assim, para o adequado desenvolvimento das plantas (MENGEL e KIRKBY, 2000).

A maior parte do cálcio contido nas plantas se encontra nos vacúolos e nas paredes celulares onde se encontra unido a polissacarídeos chamados pectatos. No citosol, parte considerável deste mineral se une a uma proteína chamada calmodulina, modificando sua estrutura e ativando diversas enzimas, atuando como mensageiro secundário nas respostas das plantas à estímulos ambientais, como no caso da regulação da abertura e fechamento estomático em função da dinâmica hídrica do solo (JARMA *et al.*, 2010; TAIZ e ZEIGER, 2013). Suas funções em processos envolvidos na fixação de  $\text{CO}_2$  e armazenamento em vacúolos explicam os maiores teores e conteúdos de cálcio nas folhas em comparação com os caules, como ocorrido em todos os nutrientes avaliados, exceto o potássio.

Com exceção do tratamento controle e da dose de  $500 \text{ mg dm}^{-3}$  de fertilizante de liberação controlada no solo, os ramos apresentaram maiores teores e conteúdos de potássio em relação as folhas (Figuras 1C e 2C). Este fato pode estar associado à maior presença deste mineral nos elementos vasculares em função de sua alta mobilidade (FAQUIN, 2005). Além da mobilidade, o potássio também está presente em grandes concentrações no floema por ser componente importante no mecanismo de transporte de fotoassimilados das folhas para órgãos de armazenamento. A função do nutriente no processo é manter o pH alto nos tubos crivados, facilitando o transporte, especialmente de sacarose (MALAVOLTA e CROCROMO, 1982; MARSCHNER, 2012).

Em estévia, um dos sintomas de deficiência de potássio é a diminuição na proporção de ramos (LIMA-FILHO e MALAVOLTA, 1997). Segundo os autores este efeito está relacionado à menor migração de fotoassimilados através dos vasos condutores, provavelmente estando relacionado com o processo de fotofosforilação, estimulado por altos níveis do íon  $K^+$ . Além disso, o potássio também exerce influência no turgor e alongamento do caule, agindo em sinergia com o ácido giberélico (DELLA GUARDIA e BENLLOCH, 1980; LIMA-FILHO e MALAVOLTA, 1997), o que também pode justificar a alta concentração e acúmulo deste nutriente observados na espécie.

O teor de potássio nas folhas apresentou resposta quadrática, enquanto que o teor e conteúdo nos ramos e conteúdo nas folhas apresentou resposta linear positiva às doses do fertilizante de liberação controlada. O fato de as doses estimularem proporcionalmente o acúmulo de potássio é devido ao nutriente ser o mineral presente em maior proporção na formulação do Basacote<sup>®</sup> Mini 6M. Para o cultivo de soja em latossolo, de maneira semelhante, concluiu-se que o teor de potássio no solo tem relação positiva com o teor foliar desse macronutriente, que, por sua vez, está positivamente relacionado com a produtividade até determinados níveis, quando as respostas passam a ser mínimas (SCHERER, 1998).

A despeito das maiores produtividades em função do potássio no solo, a aplicação deste nutriente por meio de fertilizantes solúveis convencionais apresenta o inconveniente deste nutriente ser considerado o cátion mais facilmente lixiviado, devido ao seu deslocamento para a solução do solo e percolação, especialmente em solos arenosos (MORAES e DYNIA, 1992). Estima-se que de 50 a 70% do potássio aplicado ao solo sejam perdidos por lixiviação, fazendo-se necessária a aplicação de doses extras, o que causa considerável desperdício de fertilizante (AUOADA *et al.*, 2008; WU e LIU, 2008). Neste sentido, a aplicação do nutriente com a tecnologia de liberação lenta permite maior disponibilidade do nutriente ao longo do desenvolvimento da planta, e, possivelmente, esta característica contribuiu para o aumento expressivo no conteúdo de potássio observado nas maiores doses do fertilizante no presente trabalho.

Considerando os dados obtidos, os macronutrientes na parte aérea de estévia se concentram mais nas folhas, com excessão do potássio. A ordem de nutrientes mais acumulados na parte aérea de estévia variou em função das doses do fertilizante de liberação controlada. No tratamento controle a ordem foi

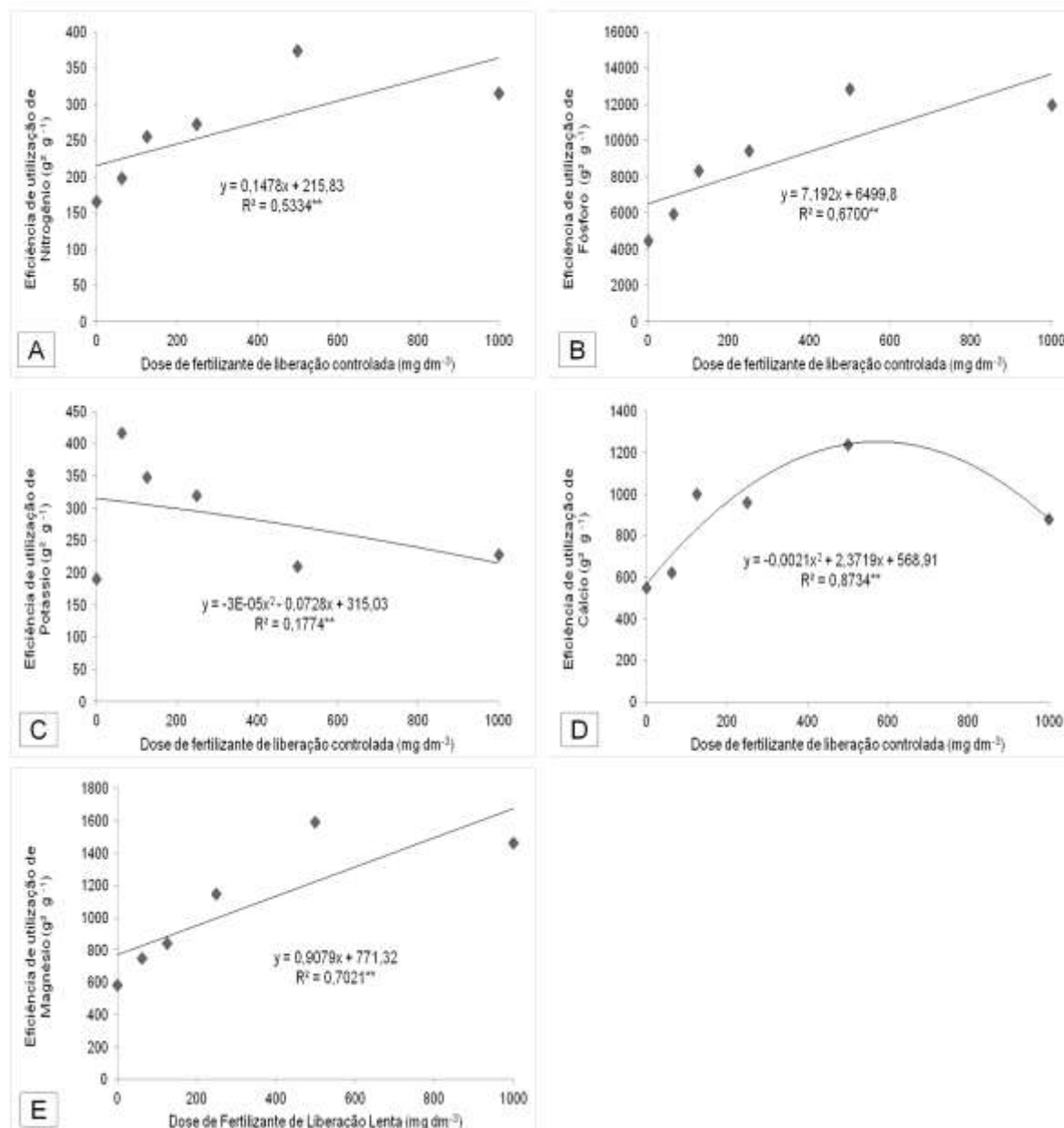
K>N>Mg>Ca>P, na dose de 62,5 mg dm<sup>-3</sup> foi N>K>Ca>Mg>P, com a utilização de 125 mg dm<sup>-3</sup> alterou-se para K>N>Mg>Ca>P. Nas doses mais elevadas (250, 500 e 1000 mg dm<sup>-3</sup>) a ordem foi K>N>Ca>Mg>P. Nas doses de 500 e 1000 mg dm<sup>-3</sup> percebeu-se aumento expressivo no acúmulo de potássio, que chegou a estar em concentrações duas vezes maior que o nitrogênio. A concentração de magnésio também nestas doses foi cerca da metade da concentração de cálcio. A expressiva redução no acúmulo de nitrogênio e magnésio em relação ao potássio e cálcio podem ter sido determinantes para a redução na produção de biomassa e eficiência nutricional, especialmente de Ca e K.

### 5.3.2 Eficiência de utilização de nutrientes

Sob ponto de vista do requerimento interno de nutrientes na planta, eficiência nutricional é conceituada como a biomassa produzida por unidade de nutriente aplicada no solo, que, por sua vez, depende de dois componentes principais: a eficiência de aquisição e a eficiência de utilização (BAILIAN et al., 1991).

A eficiência de aquisição de nutrientes está relacionada aos mecanismos de absorção e do volume de solo explorado pelas raízes, enquanto a eficiência de utilização de nutrientes depende do seu transporte para a parte aérea e da exigência metabólica (MARTINEZ et al., 1993). A eficiência nutricional pode ser calculada pelo coeficiente de utilização biológico, que consiste na razão entre a massa seca e o acúmulo de nutrientes. Alternativamente, pode ser interpretado como o inverso do teor do nutriente. Contudo, é importante que a relação de eficiência nutricional esteja associada com a produção de matéria seca, para não incidir em erro de selecionar materiais ou condições com alta relação de eficiência nutricional e produção limitada (SIDDIQUI e GLASS, 1981; STAHL *et al.*, 2013). Para tanto, Siddiqui e Glass (1981) sugerem o índice de eficiência nutricional, calculado pela relação entre a massa seca da planta e a concentração do nutriente na mesma.

No presente trabalho, as doses de fertilizante de liberação controlada influenciaram os índices de eficiência de utilização de todos os nutrientes nas folhas de estévia (Figura 3).



**Figura 3.** Índices de eficiência de utilização de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio (C), Cálcio (D) e Magnésio (E) em folhas e ramos de *Stevia rebaudiana* Bertonii em função de doses de fertilizante de liberação controlada.

Apesar de leve decréscimo na dose de  $1000 \text{ mg dm}^{-3}$ , a eficiência de utilização de nitrogênio apresentou tendência linear positiva em relação as doses de fertilizante de liberação controlada (Figura 3A). A eficiência de utilização do nitrogênio adicionado ao solo está relacionada ao grau de recuperação deste nutriente pelas plantas, uma vez que, menos de 50% do que é aplicado na forma de fertilizantes é utilizado pelas culturas. O nitrogênio é perdido principalmente pela lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e emissão de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  e outros óxidos de nitrogênio (BREDEMEIER e MUNSDSTOCK, 2000). Nesse sentido a aplicação

de fertilizantes revestidos com polímeros permite reduzir as perdas de nitrogênio, por meio da presença de uma barreira física das formas solúveis, contra a exposição do nutriente para o meio, evitando-se, assim, a atuação dos mecanismos de perdas (CIVARDI *et al.*, 2011).

Todavia, a eficiência de utilização pela planta, conforme mencionado anteriormente, leva em consideração os aspectos de transporte e metabolização deste elemento. A eficiência crescente na utilização de nitrogênio em função das doses pode ser explicada, nesse sentido, pelo balanço entre os efeitos positivos do mineral no acúmulo de biomassa e os custos energéticos para sua absorção e assimilação nas folhas.

O fato de a maior parte do nitrogênio disponível no Basacote® Mini 6M estar na forma amoniacal (Tabela 2) pode ser um fator preponderante para o aumento da eficiência de utilização do mesmo. A absorção do nitrogênio na forma amoniacal demanda menor consumo de energia, uma vez que, o processo de absorção de  $\text{NO}_3^-$  é dependente da exportação de carboidratos da parte aérea para as raízes. Os carboidratos são a fonte primária de energia para que a bomba de prótons presente na membrana bombeie íons  $\text{H}^+$  para fora da célula, produzindo um gradiente eletroquímico, necessário para que os transportadores transfiram o nitrato para dentro da célula (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000). O consumo de carboidratos neste processo pode ser um elemento fundamental para determinação da eficiência de utilização do nutriente para a conversão de biomassa.

A maior proporção de nitrogênio amoniacal também pode interferir positivamente no consumo energético para o processo de assimilação do nitrogênio. A assimilação de nitrogênio requer a transferência de 2 elétrons por  $\text{NO}_3^-$  convertido em  $\text{NO}_2^-$ , 6 elétrons por  $\text{NO}_2^-$  convertido em  $\text{NH}_4^+$  e 2 elétrons e 1 ATP por  $\text{NH}_4^+$  convertido em glutamato (TAIZ e ZEIGER, 2013). Disso decorre que a assimilação do  $\text{NO}_3^-$  demanda mais energia, em comparação à assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , em razão deste último não precisar ser reduzido para sua incorporação em aminoácidos (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000).

Além do balanço entre o acúmulo de biomassa e gasto energético para absorção e assimilação do nitrogênio, a interação com outros componentes disponíveis na formulação do fertilizante de liberação controlada, pode ser determinante para o aumento da eficiência deste elemento em função das doses. A maior disponibilidade de enxofre, terceiro mineral mais abundante na formulação do

Basacote® Mini 6M, por exemplo, pode aumentar a eficiência de utilização do nitrogênio, uma vez que a deficiência de enxofre demonstra efeitos negativos na assimilação de N, aumentando concentrações de nitrato em função da diminuição da atividade da enzima nitrito redutase (GIORDANO *et al.*, 2000; MALAVOLTA e MORAES, 2007).

A enzima nitrito redutase, responsável pela conversão de nitrito em amônio no processo de assimilação de nitrogênio é formada por um grupo polipeptídico ligado à dois grupos postéricos: um grupo ferro-enxofre,  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ , e um grupo heme especializado (TAIZ e ZEIGER, 2013). Neste sentido a maior disponibilidade não só de enxofre, mas também de ferro com aumento das doses pode ter sido um fator decisivo para o aumento da eficiência de utilização de nitrogênio a medida que se aumentaram as doses do fertilizante.

Ainda considerando o efeito positivo do fertilizante de liberação controlada nas enzimas de assimilação de nitrogênio, a presença do micronutriente molibdênio também pode ter atuado sinergeticamente com o nitrogênio. O molibdênio é componente da enzima nitrato redutase, responsável pelo primeiro passo da redução assimilatória do nitrato. A deficiência deste elemento promove acúmulo de nitrato na planta, podendo reduzir a eficiência de utilização do nitrogênio (LOPES *et al.*, 2014).

Similarmente ao observado para o nitrogênio, a eficiência de utilização de fósforo aumentou linearmente conforme doses crescentes do fertilizante de liberação controlada (Figura 3B). A maior eficiência do fósforo na conversão de biomassa, além da disponibilidade do próprio nutriente no substrato nas maiores doses, pode estar relacionada aos conteúdos superiores de magnésio nestas condições.

O fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) na solução do solo é absorvido pelas raízes das plantas por intermédio de um transportador de  $\text{H}^+ - \text{HPO}_4^{2-}$  do tipo simporte e incorporado em uma variedade de compostos orgânicos, incluindo açúcares fosfatos, fosfolipídeos e nucleotídeos. O principal ponto de entrada do fosfato na via de assimilação ocorre durante a formação do ATP, a molécula de energia da célula. Nessa reação, o fosfato inorgânico é adicionado ao segundo grupo fosfato da adenosina difosfato para formar a ligação éster fosfato (TAIZ e ZEIGER, 2013). Quase todas as enzimas fosforilativas, tanto de incorporação como de transferência do P inorgânico, dependem da presença de Mg, que é capaz de formar uma ponte entre o ATP e/ou



ADP e a molécula da enzima. Essa transferência de energia é primordial para processos de fotossíntese, respiração, reações de síntese de compostos orgânicos, expansão radicular e absorção de íons (MALAVOLTA, 2006; SILVA e TREVISAM, 2015). Nesse sentido, a presença de magnésio exerce influência tanto na assimilação do fosfato inorgânico, quanto na utilização do fósforo assimilado para acúmulo de biomassa e transferências de energia.

Além de ativar mais enzimas que qualquer outro nutriente, o magnésio também atua diretamente no processo de fotossíntese por ser um componente estrutural da molécula de clorofila (MALAVOLTA, 1980; STREIT *et al.*, 2005). Esta associação de fatores explica o aumento da eficiência de utilização do nutriente diretamente proporcional ao aumento das doses de fertilizante de liberação controlada (Figura 3E). A maior disponibilidade de magnésio, juntamente com o nitrogênio e outros elementos possivelmente foi responsável pelo aumento das taxas fotossintéticas, aumentando proporcionalmente o acúmulo de biomassa.

Outro elemento importante como ativador enzimático é o potássio. A maior disponibilidade do elemento no substrato promoveu incrementos na eficiência de utilização, havendo, no entanto, uma queda nas doses mais elevadas, de maneira similar ao observado para o cálcio (Figuras 3C e 3D). O aumento da eficiência de utilização do potássio na produção de biomassa está relacionado ao fato deste mineral executar papel importante na regulação do potencial osmótico das células, ativação de enzimas envolvidas na respiração e fotossíntese e como neutralizador de macromoléculas aniônicas (EPSTEIN e BLOOM, 2006; TAIZ e ZEIGER, 2013). O aumento da produção de biomassa pela disponibilidade de cálcio, por sua vez, está relacionado às suas funções na manutenção da integridade da parede celular, seletividade do transporte de íons, função na divisão e alongamento celular e ativação de enzimas (BENINI *et al.*, 2003)

A diminuição na eficiência de utilização nas doses mais elevadas, não obstante, pode ser atribuída ao incremento observado nos acúmulos de potássio e cálcio e a uma leve redução de biomassa (dados não apresentados) nestas condições. Os demais nutrientes avaliados apresentaram decréscimo no conteúdo foliar na dose de 1000 mg dm<sup>-3</sup> de fertilizante no solo. Como a queda na produção de biomassa foi proporcionalmente menor do que a diminuição dos teores, a eficiência de utilização de nitrogênio, fósforo e magnésio apresentou tendência linear positiva.

A redução da produção de biomassa e conteúdos de fósforo, magnésio e nitrogênio nas folhas em doses mais elevadas, nesse sentido, pode ser explicada pelo aumento dos conteúdos de cálcio e potássio, sendo este último, inclusive, o mineral mais abundante nas folhas de estévia nas doses 500 e 1000 mg de fertilizante de liberação controlada por  $\text{dm}^{-3}$  de solo.

O excesso de potássio tem ação antagonista sobre absorção de magnésio em função da competição por compostos ligantes do metabolismo do vegetal (FAGERIA, 2001). Juntamente com o efeito antagônico do cálcio, este fato explica as diminuições no acúmulo de magnésio nas folhas e, conseqüentemente, pela relação já mencionada, diminuição no acúmulo de fósforo.

Além do efeito antagônico com o magnésio, o excesso de potássio pode causar também a inibição na absorção de boro, zinco, manganês e amônio, induzindo, ou ao menos, contribuindo para a deficiência destes elementos (BERGMANN, 1992), o que pode reduzir significativamente a produção de biomassa.

## 5.4 CONCLUSÕES

Os teores de macronutrientes em estévia são maiores nas folhas em comparação aos ramos, exceto para o potássio. A aplicação do fertilizante de liberação controlada afeta a ordem de acúmulo de nutrientes na parte aérea da espécie, em doses mais elevadas a ordem é  $\text{K} > \text{N} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{P}$ , com aumento expressivo no acúmulo de potássio, que chega a atingir concentrações duas vezes maiores que o nitrogênio.

Apesar do teor de nitrogênio não ser influenciado e dos teores de fósforo e magnésio apresentarem tendência inversamente proporcional ao aumento das doses de fertilizante, o conteúdo destes nutrientes apresenta resposta positiva ao fertilizante. A similaridade nas respostas, especialmente entre magnésio e fósforo, evidencia um efeito de sinergismo.

A eficiência de utilização do nitrogênio aumenta linearmente com as doses do fertilizante. O sinergismo entre fósforo e magnésio, da mesma forma, promove índices de eficiência de utilização proporcionais às dosagens aplicadas. A diminuição na eficiência de utilização de cálcio e potássio em doses mais elevadas

está relacionada ao aumento em seus conteúdos foliares e leve decréscimo no acúmulo de biomassa nessas condições.

## 5.5 REFERÊNCIAS

AMARAL, J. F. T.; MARTINEZ, H. E. P.; LAVIOLA, B. G.; FERNANDES FILHO, E. I.; CRUZ, C. D. Eficiência de utilização de nutrientes por cultivares de cafeeiro. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 621-629, 2011. DOI: 10.1590/S0103-84782011005000027.

AUOADA, F. A.; MOURA, M. R.; MENEZES, E. A.; NOGUEIRA, A. R. A.; MATTOSO, L. H. C. Síntese de hidrogéis e cinética de liberação de amônio e potássio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 4, p. 1643-1649, 2008. DOI: 10.1590/S0100-06832008000400029.

BAILIAN, L.; McKEAND, S. E.; ALLEN, H. L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, v. 37, n. 2, p. 613 – 626, 1991.

BENINNI, E. R. Y; TAKAHASHI, H. W; NEVES, C. S. V. J. Manejo do cálcio em alface de cultivo hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n.4, p. 605 – 610, 2003. DOI: 10.1590/S0102-05362003000400005 .

BERGMANN, W (Ed.). **Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis**. New York: Gustav Fischer Publishing House Jena. 2. ed. 1992. 741 p.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000. DOI: 10.1590/S0103-84782000000200029.

CAKMAK, I.; YAZICI, A.M. Magnesium: a forgotten element in crop production. **Better Crops With Plant Food**, v. 94, n. 2, p. 23-25, 2010.

CIVARDI, E. A.; SILVEIRA NETO, A. N.; RAGAGNIN, V. A.; GODOY, E. R.; BROD, ELIAS. Ureia de liberação lenta aplicada superficialmente e ureia comum incorporada ao solo no rendimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 1, p. 52 – 59, 2011. DOI: 10.5216/pat.v41i1.8146.

CHAPMAN, S.C.; BARRETO, H.J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, v.89, n.4, p.557–562, 1997. DOI: 10.2134/agronj1997.00021962008900040004x.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBRS/NRS, 2004. 400p.

COMPO EXPERT. **Basacote®** Mini. Disponível em <file:///C:/Users/Proprietario/Downloads/8.pdf>>. Acesso em 04 Out. 2015.

DELLA GUARDIA, M.D.; BENLLOCH, M. Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants. **Physiologia Plantarum**, v.49, n.4, p. 443 – 448, 1980. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1980.tb03332.x.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Planta, 2006. 401 p.

FAGERIA, V. D. Nutrient interactions in crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.24, n.8, p.1269 – 1290, 2001. DOI: 10.1081/PLN-100106981.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 183p

FRANCISCO, F. **Acúmulo de biomassa, produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A e tolerância à geada e ao acamamento de acessos de *Stevia rebaudiana* Bert.** 2015. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015.

GIORDANO, M.; PEZZONI, V.; HELL, R. Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2., p. 857 – 864, 2000.

GUARESCHI, R. F.; GAZOLLA, P. R.; PERIN, A.; SANTINI, J. M. K. Adubação antecipada na cultura da soja com superfosfato triplo e cloreto de potássio revestidos por polímeros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 643-648, 2011. DOI: 10.1590/S1413-70542011000400001.

JARMA, A. J.; COMBATT, E. M.; CLEVES, J. A. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. **Agronomía Colombiana**, v. 28, n. 2, p.199 – 208, 2010.

KÖPPEN, W. **Grundriss der klimakunde**. Berlin: W. Guyter, 1931. 390p.

LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; AH-HEN, K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n.3, p 1121–1132, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140.

LIMA FILHO, O. F.; MALAVOLTA, E. Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1 - 2, p. 53 – 61, 1997. DOI: 10.1590/S0103-90161997000100008.

LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E; SENA, J.O.A.; CARNEIRO, J.W. Absorção e acumulação de nutrientes em estévia *Stevia rebaudiana* (bert.) bertoni: I.

macronutrientes. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1 – 2 , p. 14-22, 1997. DOI: 10.1590/S0103-90161997000100003.

LOPES, J. F.; COELHO, F. C.; RANGEL, O. J. P.; RABELLO, W. S.; GRAVINA, G. A.; VIEIRA, H. D. Adubação foliar com níquel e molibdênio no feijoeiro comum cv. Ouro Vermelho. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 234 - 240, 2014. DOI: 10.1590/S0034-737X2014000200011.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MALAVOLTA, E.; CROCOMO, O. J. Funções do potássio nas plantas. In: YAMADA, T.; IGUE, K.; MUZILLI, O.; USHERWOOD, N. R. **Potássio na agricultura brasileira**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1982. p. 95 – 162.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F. Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S.; VITTI, G.C. (Ed.). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007. p.189 – 249.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.

MANDAL, S.; EVELINA, H.; GIRI, B.B.; SINGHA,V.P.; KAPOOR, R. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 187–194, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.07.003.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3.ed London: Elsevier, 2012. 643p.

MARTINEZ, H.E.P.; NOVAIS, R.F.; SACRAMENTO, L.V.S.; RODRIGUES, L.A. Comportamento de variedades de soja cultivadas sob diferente níveis de fósforo: II. Translocação do fósforo absorvido e eficiência nutricional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.17, n.2, p.239 – 244, 1993

MARTINS, A. P. L.; REISSMANN, C. B. Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químico-analíticos. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2007.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principios de nutrición vegetal**. Basel: International Potash Institute, 2000. 692p.

METIVIER, J.; VIANA, A.M. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, n. 6, p.1211–1222, 1979. DOI: 10.1093/jxb/30.6.1211.

MOORE, D. P.; OVERSTREET, R.; JACOBSON, L. Uptake of magnesium & its interaction with calcium in excised barley roots. **Plant Physiology**, v. 36, n.3, p. 290 – 295, 1961.

MORAES, J. F. V.; DYNIA, J. F. Alterações nas características químicas e físico-químicas de um solo Gley Pouco Húmico sob inundação e após a drenagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 223-235, 1992.

MOREIRA, A.; CARVALHO, J. G.; EVANGELISTA, A. R. Influência da relação cálcio:magnésio do corretivo na nodulação, produção e composição mineral da alfafa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 249-255, 1999. DOI: 10.1590/S0100-204X1999000200014 .

ORLANDO FILHO, J. O.; BITTENCOURT, V. C.; CARMELLO, Q. A. C.; BEAUCLAIR, E. G. F. Relações K, Ca e Mg de solo areia quartzosa e produtividade da cana-de-açúcar. **Stab, Açúcar Álcool e Subprodutos**, v. 14, n. 5, p. 13 – 17, 1996.

POZZA, A. A. A.; CARVALHO, J. G.; GUIMARES, P. T. G.; FIGUEIREDO, F. C.; ARAÚJO, A. R. Suprimento do silicato de cálcio e a eficiência nutricional de variedades de cafeeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 6, p. 1705-1714, 2009. DOI: 10.1590/S0100-06832009000600019.

QUAGGIO, J.A. **Acidez e calagem em solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2000. 111p.

ROSSA, Ü. B.; ANGELO, A. C.; BOGNOLA, I. A.; WESTPHALEN, D. J. MILANI, J. E. F. Fertilizante de liberação controlada no desenvolvimento de mudas de eucalyptus grandis. **Floresta**, v. 45, n. 1, p. 85 – 96, 2015. DOI: 10.5380/ufv.v45i1.31224.

SALVADOR, J. T.; CARVALHO, T. C.; LUCCHESI, L. A. C. Relações cálcio e magnésio presentes no solo e teores foliares de macronutrientes. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 1, p. 27-32, 2011.

SCHERER, E. E. Níveis críticos de potássio para a soja em latossolo húmico de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 22, n.1, p. 57-62, 1998. DOI: 10.1590/S0100-06831998000100008.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 4, n.3, p. 289 – 302, 1981. DOI: 10.1080/01904168109362919.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Comparison of means of agricultural experimentation data through different tests using the software Assisat. **African Journal of Agricultural Research**, v.37, n. 11, p.3527-3531, 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11523.

SILVA, M. L. S.; TREVISAM, A. R. Interações iônicas e seus efeitos na nutrição das plantas. **Informações agrônômicas**, n. 149, p. 10 – 16, 2015.

SORATTO, R. P.; CARVALHO, M. A. C.; ARF, O. Teor de clorofila e produtividade do feijoeiro em razão da adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 895 – 901, 2004 DOI: 10.1590/S0100-204X2004000900009.

STAHL, J.; ERNANI, P. R.; GATIBONI, L. C.; CHAVES, D. M.; NEVES, C. U. Produção de massa seca e eficiência nutricional de clones de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* em função da adição de doses de fósforo ao solo. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 2, p. 287 – 295, 2013. DOI: 10.5902/198050989275.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005. DOI: 10.1590/S0103-84782005000300043.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TEIXEIRA, J.L.; BARROS, N.F.; COSTA, L.M.; CAMPOS, J.C.C.; LEAL, P.G.L. Biomassa e conteúdo de nutrientes de duas espécies de eucalipto em diferentes ambientes do Médio Rio Doce, MG. **Revista Árvore**, v. 13, n. 1, p. 34-50, 1989.

WÖLWER-RIECK, U. The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 886–895, 2012. DOI: 10.1021/jf2044907.

WU, L.; LIU, M. Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 2, p. 240-247, 2008. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.08.020.

ZAHRANI, S. Utilization of polyethylene and paraffin waxes as controlled delivery systems for different fertilizers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v.39, n.3, p.367–371, 2000. DOI: 10.1021/ie980683f.

## 6 EFEITO DE DOSES DE FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA NO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE GLICOSÍDEOS DE ESTEVIOL EM *Stevia rebaudiana* Bertoni

### RESUMO

Uma das alternativas tecnológicas desenvolvidas para otimizar a absorção de nutrientes pelas plantas são os fertilizantes de liberação controlada. A utilização desta tecnologia requer conhecimento das respostas de espécies com potencial econômico aos fertilizantes disponíveis. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de doses do fertilizante de liberação controlada de marca comercial Basacote® Mini 6M em aspectos fisiológicos e produtivos de um acesso de *S. rebaudiana*. O experimento foi conduzido em vasos, em casa de vegetação e avaliou a resposta das plantas quando submetidas às doses de 0; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 mg dm<sup>-3</sup> de fertilizante de liberação controlada, incorporado ao solo. As doses foram comparadas entre si por meio de análise de regressão e comparadas qualitativamente à dosagem de nitrogênio, fósforo e potássio recomendada para a espécie, fornecida por meio de fertilizantes solúveis comuns. As variáveis altura, número de ramificações, área foliar, massa seca de folhas e massa seca de parte aérea apresentaram respostas quadráticas às doses do fertilizante de liberação controlada. Os teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A também apresentaram resposta no modelo quadrático, com pontos de máximo de 584,1 e 462,5 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente. Recomenda-se a utilização de doses entre 625,04 e 640,17 mg dm<sup>-3</sup> do Basacote® Mini 6M, correspondentes às doses de máxima eficiência técnica para produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, respectivamente. O alto custo dos fertilizantes de liberação controlada faz necessário o estudo da viabilidade econômica para utilização desta tecnologia no cultivo de estêvia.

**Palavras-chave:** Basacote®, estêvia, esteviosídeo, rebaudiosídeo A.



**THE EFFECTS OF CONTROLLED RELEASE FERTILIZER DOSES ON  
VEGETATIVE DEVELOPMENT AND STEVIOL GLYCOSIDES PRODUCTION IN  
*Stevia rebaudiana***

**ABSTRACT**

One of the technological alternatives developed to optimize the absorption of nutrients by the plants are the controlled release fertilizers. The use of this technology requires knowledge of the responses of plant species with economic potential to the available fertilizers. The objective of the present study was to evaluate the effect of doses of the commercially available controlled release fertilizer Basacote® Mini 6M on physiological and productive aspects of a *S. rebaudiana* accession. The experiment was conducted in plastic pots, under greenhouse conditions and evaluated the response of plants when submitted to doses of 0; 62.5; 125; 250; 500 and 1000 mg dm<sup>-3</sup> of controlled release fertilizer, incorporated into the soil. The doses were compared to each other by regression analysis and qualitatively compared to the nitrogen, phosphorus and potassium dosage recommended for the species, provided by common soluble fertilizers. The variables height, number of branches, leaf area, leaf dry mass and shoot dry mass presented quadratic responses to controlled release fertilizer doses. The contents of stevioside and rebaudioside A also showed response in the quadratic model, with maximum points of 584.1 and 462.5 mg dm<sup>-3</sup>, respectively. It is recommended to use doses between 625.04 and 640.17 mg dm<sup>-3</sup> of Basacote® Mini 6M, corresponding to the doses of maximum technical efficiency for production of stevioside and rebaudioside A, respectively. The high cost of controlled release fertilizers makes it necessary to study the economic feasibility of using this technology in stevia cultivation.

**Key words:** Basacote®, rebaudioside A, stevia, stevioside.

## 6.1 INTRODUÇÃO

Estima-se que cerca de 40 a 70 % do nitrogênio, 80 a 90 % do fósforo, e 50 a 70 % do potássio aplicados ao solo em forma de fertilizantes solúveis não sejam absorvidos pelas plantas, o que provoca não só grandes perdas de recursos econômicos, mas também prejuízos ambientais devido à poluição (WU e LIU, 2008). Nesse sentido, uma das alternativas tecnológicas desenvolvidas para otimizar a absorção de nutrientes pelas plantas são os fertilizantes de liberação lenta ou controlada (LIANG e LIU, 2006).

Define-se fertilizante de liberação lenta como o fertilizante que apresenta propriedade de atrasar a disponibilidade para absorção e uso pelas plantas após a aplicação ou que prolongue de maneira significativa o tempo de liberação do nutriente no solo, em relação às fontes solúveis tradicionais (TRENKEL, 1997). Um dos mecanismos para prolongar o tempo de liberação dos nutrientes é o revestimento ou encapsulamento dos grânulos com polímeros. Os grânulos revestidos, ao absorverem água do solo, solubilizam os nutrientes no interior das cápsulas, e, gradativamente, os liberam por meio de estrutura porosa na zona da raiz (GUARESCHI *et al.*, 2011). Este mecanismo confere menores perdas de nutrientes por lixiviação, volatilização e fixação, possibilitando reduzir a dose aplicada (ZAHIRANI, 2000).

A maioria dos trabalhos com fertilizantes de liberação controlada foram desenvolvidos em outros países, sob condições diferentes das do Brasil, o que torna necessária a condução de experimentos envolvendo fertilizantes revestidos por polímeros em condições edafoclimáticas brasileiras (GUARESCHI *et al.* 2011) e com espécies com potencial uso nestas condições. Tais trabalhos são de extrema importância, pois permitem estabelecer relações custo-benefício, bem como quantificar a eficiência agrônômica da adubação, validando, dessa forma, o emprego desse tipo de fertilizante (GIRARDI e MOURÃO FILHO, 2003).

Uma das espécies que possui potencial para exploração no território brasileiro é conhecida como estêvia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). A nível global estimava-se uma movimentação de 11 bilhões de dólares em 2015 em produtos de estêvia (ANKIT, 2014). Considerando o contexto brasileiro, a produção não é suficiente para suprir a demanda interna, sendo registrada uma importação de mais de 3 milhões de dólares em produtos oriundos da espécie no ano de 2016 (BRASIL, 2017).

A importância econômica da planta se deve à produção de metabólitos secundários denominados glicosídeos diterpênicos ou glicosídeos de esteviol, com alto potencial edulcorante e sem valor calórico. Destes glicosídeos, os de valor comercial mais elevado são o esteviosídeo e rebaudiosídeo A, por volta de 300 e 400 vezes mais doces que a sacarose, respectivamente (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012; MANDAL *et al.*, 2013).

O conteúdo de glicosídeos diterpênicos, especialmente o de esteviosídeo, é positivamente correlacionado com a biomassa de folhas (METIVIER e VIANA, 1979), que, por sua vez, depende de práticas agrícolas como a aplicação de fertilizantes (MANDAL *et al.*, 2013). Dessa maneira, são necessários estudos no sentido de avaliar como os diferentes fertilizantes afetam a produção de massa seca de folhas e os teores de substâncias edulcorantes.

Apesar de serem relativamente abundantes as pesquisas relacionadas a aspectos nutricionais em estêvia (LIMA-FILHO e MALAVOLTA, 1997; LIMA-FILHO *et al.*, 1997 a; LIMA-FILHO *et al.*, 1997 b; JARMA *et al.* 2010; PATIL, 2010; MANDAL *et al.*, 2013; PAL *et al.*, 2013; PAL *et al.*, 2015 a; TAVARINI *et al.*, 2016), não são encontrados na literatura relatos sobre a aplicação de fertilizantes de liberação controlada, seus efeitos no metabolismo secundário e suas implicações produtivas na espécie.

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de doses do fertilizante de liberação controlada de marca comercial Basacote® Mini 6M em aspectos fisiológicos e produtivos de um acesso de *S. rebaudiana* com potencial para utilização na região sul do Brasil.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Localização, instalação, condução do experimento, material vegetal, produção de mudas, delineamento experimental e tratamentos foram realizados conforme descrito nos itens 5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3, páginas 108 a 110.

Determinação de teores de glicosídeos diterpênicos, clorofilas, proteínas e açúcares totais foi realizada de acordo com o descrito nos itens 3.2.5, 3.2.6, 3.2.7 e

3.2.8, páginas 52 a 54. As produtividades de glicosídeos diterpênicos foram calculadas pela multiplicação dos teores pela biomassa seca de folhas.

#### 6.2.1 Colheita e avaliações biométricas

As plantas foram colhidas com corte a 5 cm do solo. A altura da base até o ápice da planta foi medida com régua graduada e o número de ramificações do (s) ramos (s) principais foi contado. Após este procedimento as folhas foram separadas do caule e flores manualmente e pesadas para determinação de massa fresca de folhas e de parte aérea. Em seguida realizou-se a determinação da área foliar, utilizando um scanner óptico acoplado ao programa Win Rhizo pró v. 2002c (RÉGENT INSTRUMENTS INC., 2004).

Os ramos e folhas foram armazenados em sacos de papel multifoliado Kraft® e permaneceram em secador com circulação de ar forçado a 65 °C até peso constante, quando foram novamente pesados para determinação da massa seca de folhas e massa seca total da parte aérea.

#### 6.2.2 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para avaliação da homogeneidade das variâncias e à análise de variância ANOVA. As doses foram comparadas por meio de análise de regressão. O critério para a escolha do modelo foi a significância pelo teste F a 5% de probabilidade de erro e os maiores valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Utilizou-se o programa estatístico ASSISTAT® (SILVA e AZEVEDO, 2016).

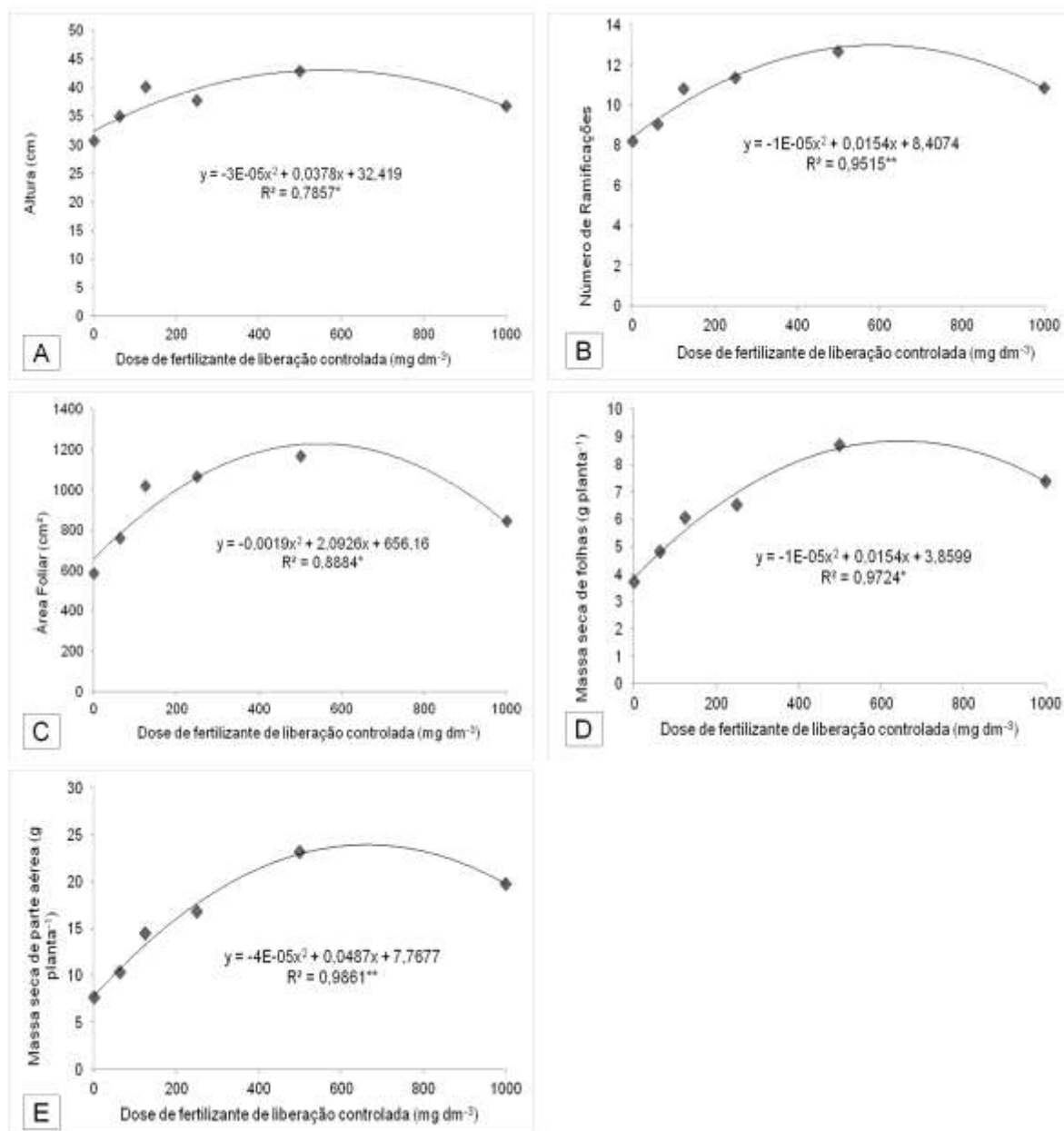
### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 6.3.1 Variáveis biométricas

As variáveis altura, número de ramificações, área foliar, massa seca de folhas e massa seca de parte aérea responderam significativamente às doses do fertilizante (Figura 1).

A altura das plantas apresentou resposta quadrática às doses do fertilizante, com ponto de máximo em 630 mg dm<sup>-3</sup> (Figura 1A). Em trabalho com mudas de *Eucalyptus grandis* também foi observado incremento na altura das plantas com a

aplicação de fertilizante de liberação lenta, e, além disso, todas as mudas que receberam doses do fertilizante encapsulado apresentaram altura superior às tratadas com doses equivalentes de fertilizante comum. Segundo os autores isto aponta para a importância de uma contínua disponibilização dos nutrientes durante o período de desenvolvimento da planta (ROSSA *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Efeito de doses de fertilizante de liberação controlada na altura (A), número de ramificações (B), área foliar (C), massa seca de folhas (D) e massa seca de parte aérea (E) em *Stevia rebaudiana*. Curitiba/PR, 2017.

O incremento em altura em função das doses do fertilizante pode ser justificado, entre outros efeitos, pela maior disponibilidade de potássio para as

plantas, uma vez que esse elemento atua em sinergia com ácido giberélico nos mecanismos de alongamento caulinar (DELLA GUARDIA e BENLLOCH, 1980).

O potássio é considerado o cátion mais facilmente lixiviado, devido ao seu deslocamento para a solução do solo e percolação (MORAES e DYNIA, 1992). Nesse sentido, a aplicação do nutriente com a tecnologia de liberação lenta permitiu maior disponibilidade ao longo do desenvolvimento da planta, e, possivelmente, contribuiu para o crescimento das plantas em altura e também no incremento do número de ramificações (Figura 1B).

Em estévia, um dos sintomas de deficiência de potássio é a diminuição na proporção de ramos (LIMA FILHO e MALAVOLTA, 1997). Segundo os autores este efeito está relacionado à menor migração de fotoassimilados através dos vasos condutores, uma vez que o processo de fotofosforilação é estimulado por altos níveis do íon  $K^+$ . Corroborando com este estudo, Pal *et al.* (2013), verificaram que de todos os fertilizantes aplicados em estévia o  $KNO_3$ , único contendo potássio, promoveu maiores produtividades de massa seca de ramos.

Além do efeito do potássio, o estímulo ao crescimento e desenvolvimento radicial em função da maior disponibilidade de nutrientes pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo maior número de ramificações. Considerando o fato de que a síntese de citocininas ocorra principalmente nos ápices radiculares/radiciais (TAIZ e ZEIGER, 2013), um sistema radicial mais desenvolvido permite maior produção destes fitohormônios e sua exportação para os caules, onde estimulam a produção de ramos laterais (PAL *et al.*, 2015b).

Em estévia, o número de ramificações foi positivamente correlacionado com o índice de área foliar em função da ação das citocininas no atraso da senescência (PAL *et al.*, 2015b). No presente trabalho também verificou-se semelhança na resposta do número de ramificações com a área foliar (Figuras 1B e 1C). Ambas apresentaram comportamento quadrático em relação às doses do fertilizante de liberação controlada.

A área foliar é uma variável relevante em estudos de nutrição e crescimento vegetal, porque, além de afetar o acúmulo de matéria seca, fornece informações sobre o metabolismo vegetal, capacidade fotossintética potencial, rendimento e qualidade da colheita (SOUZA *et al.* 2012). A dose de máxima eficiência técnica para esta variável foi de  $550,68 \text{ mg dm}^{-3}$ . O incremento observado pode ser atribuído ao efeito positivo do nitrogênio, segundo elemento mais abundante na formulação do

Basacote<sup>®</sup> Mini 6M (Tabela 2, capítulo 5), uma vez que este mineral atua na divisão e expansão celular nas folhas, promovendo incrementos na área foliar (CHAPIN, 1980).

Considerando a influência da área foliar na captação de energia e fixação de CO<sub>2</sub>, são esperadas as respostas positivas do fertilizante na massa seca de folhas e massa seca de parte aérea (Figura 1D e 1E).

São relatados para várias espécies, especialmente para mudas florestais e frutíferas, os incrementos na massa seca de parte aérea em função da aplicação de fertilizantes contendo macro e micronutrientes encapsulados por polímeros (MELO *et al.*, 2001; SCVITTARO *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2011; ROSSA *et al.*, 2011; RÓS *et al.*, 2013; ROSSA *et al.*, 2013; ROSSA *et al.*, 2014; ROSSA *et al.*, 2015, entre outros). O fato destes produtos conterem diversos minerais dificulta o entendimento do mecanismo por trás deste estímulo, que, provavelmente seja decorrente de um efeito conjunto dos nutrientes. É consenso, no entanto, que a disponibilização contínua, especialmente de elementos facilmente lixiviados como nitrogênio e potássio, seja um dos motivos para o incremento na produtividade das espécies quando submetidas aos fertilizantes de liberação lenta ou controlada.

Dentre os componentes do fertilizante de liberação controlada utilizado no presente trabalho, o nitrogênio é um dos elementos cuja maior concentração nas plantas foi apontada como responsável pelo acúmulo superior de biomassa em função do aumento do número e tamanho de folhas (HAGEMANN e BELOW, 1990).

Segundo Mandal *et al.* (2013) o acúmulo de biomassa em plantas é também dependente de sua capacidade de maximizar a fotossíntese, que, dentre outros fatores, é fundamentalmente dependente do aspecto nutricional. Além do papel do nitrogênio na composição estrutural do vegetal e na fotossíntese, outros nutrientes disponíveis na formulação do Basacote<sup>®</sup> Mini 6M também possuem função importante neste sentido. Magnésio e fósforo, por exemplo, são especialmente empregados nas reações de fotofosforilação (como a formação de ATP nos cloroplastos), fixação fotossintética do CO<sub>2</sub>, carboxilação/regeneração de RuBP, e formação de clorofila (CAKMAK e YAZICI, 2010), diretamente relacionados ao acúmulo de biomassa.

Em experimento avaliando o efeito de inoculação micorrízica no cultivo de *Stevia rebaudiana* em vasos, Mandal *et al.* (2013) relataram valores máximos de

pouco menos de 8 gramas para biomassa fresca de parte aérea, inferiores aos observados no presente trabalho. Em experimento de cultivo a campo com aplicações foliares de fertilizantes, no entanto, Pal *et al.* (2013) reportaram valores máximos de massa seca de folhas superiores a 40 gramas por planta, cerca de 5 vezes maiores que os máximos observados no presente trabalho. Estas variações se dão em função das diferenças entre genótipos e condições de cultivo. Uma observação comum entre os trabalhos, todavia, é a resposta positiva da espécie à aplicação de fertilizantes.

No trabalho de Pal *et al.* (2013) aplicações foliares de  $\text{KNO}_3$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  mostraram-se mais efetivas para incrementos de biomassa em relação à outros fertilizantes. Os autores atribuíram este resultado ao fato do  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  possuírem um efeito sobre o crescimento de gemas axilares através da manutenção de um nível elevado de citocininas e consequentemente inibição do ácido abscísico, além das implicações diretas destes nutrientes sobre o crescimento vegetal, como ativação de enzimas e estímulo à fotossíntese.

A presença de micronutrientes também pode estar associada a maiores produtividades de biomassa observadas nesta pesquisa. O cobre, por exemplo, é um componente da plastocianina, uma proteína carreadora de elétrons localizada no lúmen dos cloroplastos, fundamental para o processo de produção de energia através da captação de luz (TAIZ e ZEIGER, 2013). Aplicações de cobre no meio de cultura de cultivo *in vitro* de estêvia aumentou a produção de biomassa em concentrações adequadas (JAIN *et al.*, 2009). Outros micronutrientes como ferro e molibdênio, são componentes de enzimas envolvidas na assimilação de nitrogênio (TAIZ e ZEIGER, 2013; LOPES *et al.*, 2014), podendo contribuir para o acúmulo de biomassa pela maior disponibilidade de aminoácidos.

Ainda em relação à assimilação do nitrogênio são importantes os efeitos do enxofre, cuja deficiência provoca aumento nas concentrações de nitrato em função da diminuição da atividade da enzima nitrito redutase (GIORDANO *et al.*, 2000; MALAVOLTA e MORAES, 2007) e do potássio, cuja aplicação promoveu aumento das taxas fotossintéticas e atividade da nitrito redutase em cultivo de estêvia na China (MA e SHI, 2011).

A redução observada em todos os parâmetros nas doses mais elevadas pode estar associada a uma acidificação do solo. Em trabalho com aplicação de Osmocote<sup>®</sup>, fertilizante de liberação controlada com formulação semelhante ao



utilizado no presente trabalho, em mudas de abacaxizeiro, o pH foi reduzido com o aumento das doses (FREITAS *et al.*, 2011). Os problemas de um solo ácido estão relacionados com a menor disponibilidade de alguns nutrientes e com a ocorrência de toxidez de  $Al^{+3}$  (SILVA e RANNO, 2005).

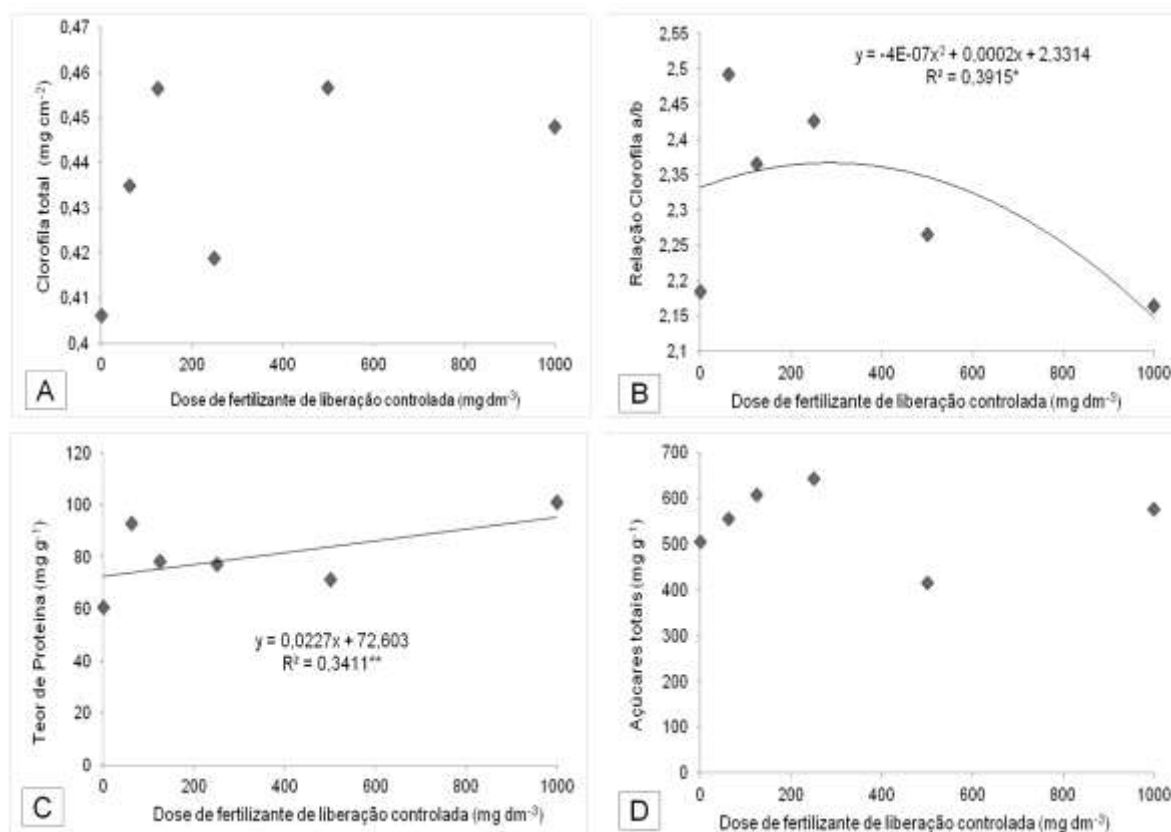
Outro problema relacionado à dosagem de  $1000\text{ mg dm}^{-3}$  do fertilizante de liberação controlada utilizado nesta pesquisa pode ser o excesso de potássio, elemento mais abundante na formulação do adubo (Tabela 2). No trabalho de Freitas *et al.* (2011), citado anteriormente, as diferentes doses de Osmocote® proporcionaram acúmulo de potássio nos substratos, o que, conseqüentemente, acarretou no maior acúmulo de K nas plantas. Segundo os autores, alguns nutrientes, quando em elevadas concentrações, podem prejudicar as plantas, tornando-se tóxicos.

O excesso de potássio tem ação antagonista sobre absorção de magnésio em função da competição por compostos ligantes do metabolismo do vegetal (FAGERIA, 2001). Além do prejuízo à absorção de magnésio, o excesso de potássio pode causar também a inibição na absorção de boro, zinco, manganês e amônio, induzindo, ou ao menos, contribuindo para a deficiência destes elementos (BERGMANN, 1992), o que pode reduzir significativamente a produção de biomassa e demais variáveis biométricas avaliadas.

### 6.3.2 Variáveis bioquímicas

As doses do fertilizante de liberação lenta apresentaram efeito significativo apenas para a relação entre clorofila *a/b* e teor de proteínas (Figura 2). Os teores de clorofila *a*, *b* (dados não apresentados) e total (Figura 2A) não apresentaram respostas significativas às doses do fertilizante de liberação controlada. Resultados semelhantes foram observados por Pagliarini *et al.* (2014) para mudas de jequitibá, onde não se observou diferenças para os teores de clorofilas com a adição de Osmocote® no substrato. Em cultivo de estêvia, Pal *et al.* (2015 a) também relataram que aplicações de nitrogênio, fósforo e potássio não apresentaram efeitos significativos nos teores de clorofila *a* e clorofila *b* no primeiro ano de cultivo. No segundo ano, no entanto, a maior dose de nitrogênio ( $90\text{ kg ha}^{-1}$ ) aumentou significativamente o teor de clorofila *b*, diminuindo a razão clorofila *a/b*.

No presente trabalho, de maneira similar, também foi observada uma redução da relação clorofila *a/b* nas doses mais elevadas, sendo a resposta quadrática para esta variável, com ponto de máximo em 250 mg dm<sup>-3</sup> do fertilizante de liberação controlada no solo (Figura 2 B).



**Figura 2.** Efeito de doses de fertilizante de liberação controlada nos teores de clorofilas (A), relação clorofila *a/b* (B), teores de proteínas (C) e teores de açúcares totais (D) em *Stevia rebaudiana*. Curitiba/PR, 2017.

A relação clorofila *a / b* pode ser um indicador útil da partição de N na folha, porque esta proporção está correlacionada com a proporção entre núcleos de fotossistema II (PSII) e proteínas do complexo de captação de luz II (LHCII). LHCII contém a maioria de clorofila *b*, e consequentemente tem uma menor relação clorofila *a / b* do que outras proteínas de ligação associadas com PSII. Quando a oferta de N se torna limitante, especialmente sob alta luminosidade, a alocação proporcional de N à PSII deve aumentar à custa da diminuição da alocação de N para a rubisco, enquanto a alocação de N para LHCII é mantida a um nível similar. Consequentemente, a proporção de PSII para LHCII (e a relação Chl *a/b*) deve aumentar com a disponibilidade de N decrescente (HIKOSAKA e

TERASHIMA,1995; TERASHIMA e HIKOSAKA 1995; KITAJIMA e HOGAN, 2003). Este mecanismo pode ter impacto direto no processo fotossintético, influenciando a produção de biomassa e produção de esqueletos de carbono utilizados na síntese de glicosídeos de esteviol.

Para os açúcares totais (Figura 2 D) os resultados diferem do observado por Patil (2010), que relatou incrementos nos teores ao utilizar tratamento com vermicomposto e NPK. Mandal *et al.* (2013) relatam que a concentração de carboidratos totais foi maior em plantas colonizadas por micorrizas sem aplicação de fósforo do que em plantas sem colonização e com suplementação de fósforo. Apesar da utilização de carbono fixado das plantas pelos fungos micorrízicos, o incremento nas taxas fotossintéticas fornecido por meio da associação tende a compensar as perdas, aumentando a fotossíntese líquida e os teores de açúcares totais (MANDAL *et al.*, 2013).

Em trabalho com nutrição de estêvia no Irã, Bidabadi *et al.* (2016), relatam que a maior disponibilidade de nutrientes pela aplicação de vermicomposto, de maneira semelhante ao presente trabalho, não influenciou o teor de açúcares totais. Os autores reiteram, no entanto, que houve um incremento nos teores de proteína com a utilização do fertilizante.

No presente trabalho os teores de proteína apresentaram comportamento linear positivo em relação ao aumento das doses do fertilizante de liberação controlada (Figura 2 C). O incremento crescente nos teores de proteínas em função das doses do fertilizante pode estar diretamente relacionado com a disponibilidade de nitrogênio. Dentre os nutrientes essenciais aos vegetais, o nitrogênio é o mais extraído pelas plantas, sendo componente essencial de aminoácidos e proteínas (CANTARELLA, 2007 ).

Além do nitrogênio, o enxofre, também abundantemente disponível na formulação do Basacote<sup>®</sup> Mini 6M, faz parte dos aminoácidos metionina e cisteína, que são essenciais para formação de proteínas. Os aminoácidos com enxofre formam as chamadas "pontes de enxofre", que contribuem para a estrutura terciária das proteínas (EPSTEIN e BLOOM, 2006). A relação supracitada entre ferro e molibdênio na assimilação do nitrogênio também pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento nos teores de proteínas.

É conveniente ressaltar que o nitrogênio em excesso, se absorvido e metabolizado, induz nas plantas o aumento no teor de proteína em detrimento de

carboidratos (MARSCHNER, 2012), o que pode ter implicações diretas na redução dos teores de biomassa observados na maior dose do fertilizante de liberação controlada e, possivelmente nos teores de glicosídeos de esteviol, discutidos no tópico seguinte.

### 6.3.3 Glicosídeos de esteviol

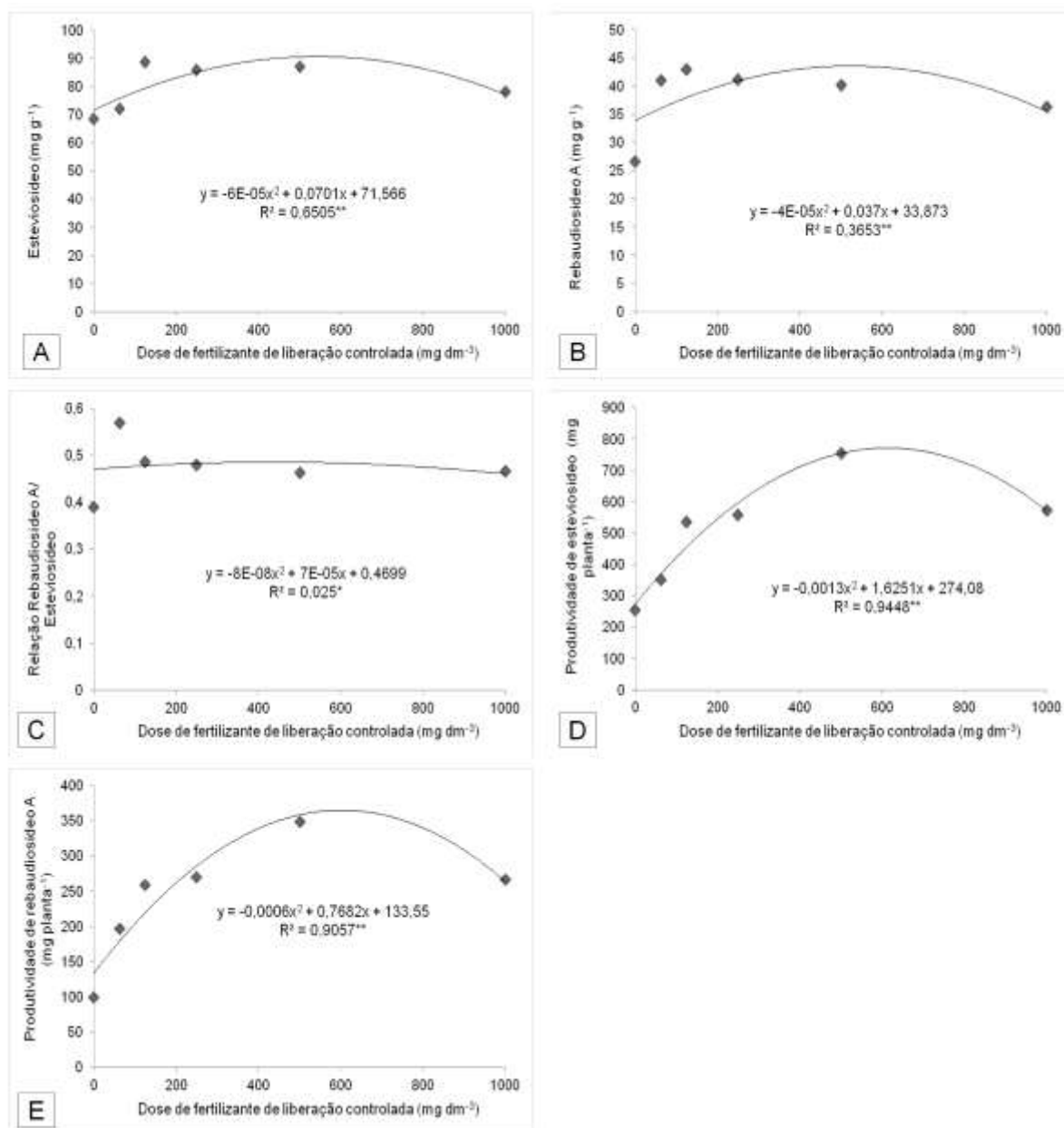
Todas as variáveis relacionadas aos glicosídeos de esteviol foram significativamente influenciadas pelas doses do fertilizante avaliado. Os teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo apresentaram resposta no modelo quadrático, com pontos de máximo de 584,1 e 462,5 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente (Figura 3).

O incremento dos teores de glicosídeos de esteviol com a aplicação do fertilizante possivelmente está relacionado à estimulos na área foliar (Figura 1C) observados em função do nitrogênio disponível, uma vez que os teores de pigmentos não apresentaram variação significativa. Considerando a relação direta entre área foliar e atividade fotossintética, é possível atribuir o incremento na produção de glicosídeos de esteviol à maior disponibilidade de fotoassimilados, uma vez que as duas moléculas precursoras para a via do MEP (gliceraldeído-3-fosfato e piruvato) derivam diretamente da fotossíntese ou da glicólise (BARBET-MASSIN *et al.*, 2015). Pal *et al.* (2015 a) relataram aumentos nos teores de glicosídeos diterpênicos com a aplicação de KNO<sub>3</sub> e Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> em função do incremento na concentração de pigmentos fotossintéticos, diretamente relacionados com aumento na fotossíntese líquida. Os teores relatados pelos autores foram semelhantes aos observados no presente trabalho, com máximos de 97,2 e 37,8 mg g<sup>-1</sup> de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, respectivamente.

Um maior fornecimento de fotoassimilados, especialmente sacarose, pode estimular a síntese de glicosídeos de esteviol aumentando o acúmulo de transcritos da via de síntese, alterando a expressão de enzimas envolvidas nesta rota biossintética e de maneira direta na glicosilação da molécula de esteviol (MANDAL *et al.*, 2013; CEUNEN e GEUNS, 2013).

Em experimento realizado na Itália, a aplicação de 150 kg de N ha<sup>-1</sup> promoveu maiores acúmulos de rebaudiosídeo A e consequente aumento da relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo por meio do estímulo da assimilação de carbono, maior condutância estomática, atividade da rubisco e eficiência do PSII (TAVARINI

et al., 2016). A maior eficiência do PSII está relacionada, conforme mencionado anteriormente, a decréscimos na relação clorofila a/b, como o observado no presente trabalho para doses onde havia maior disponibilidade de nitrogênio no substrato.



**Figura 3.** Efeito de doses de fertilizante de liberação controlada nos teores de esteviosídeo (A), rebaudiosídeo A (B), Relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo (C), produtividade de esteviosídeo (D) e produtividade de rebaudiosídeo A em *Stevia rebaudiana*. Curitiba/PR, 2017.

Além dos efeitos do nitrogênio, fósforo e magnésio também são fundamentais para a síntese de glicosídeos uma vez que participam diretamente de reações que

levam à formação de isopentenildifosfato (IPP), primeiro composto isoprenoide na síntese de glicosídeos de esteviol em *Stevia rebaudiana* (JARMA *et al.*, 2010). O excesso de potássio e consequente efeito antagônico ao magnésio pode ter sido, de modo semelhante ao observado para a biomassa, o motivo para decréscimo nos teores e produtividades de glicosídeos de esteviol em doses mais elevadas do fertilizante de liberação controlada.

Considerando o maior valor econômico do rebaudiosídeo A em comparação ao esteviosídeo, a razão endógena rebaudiosídeo A/esteviosídeo é uma importante medida para avaliar a qualidade de materiais genéticos e práticas de cultivo para extração comercial (YADAV *et al.*, 2011; CEUNEN e GEUNS, 2013 ). No presente trabalho esta variável também apresentou resposta quadrática às doses, com a dose de máxima eficiência técnica de  $437,5 \text{ mg dm}^{-3}$  do fertilizante de liberação controlada no solo (Figura 3C). A baixa correlação, observada pelo valor do coeficiente de determinação ( $R^2=0,025$ ), no entanto, limita a utilização deste parâmetro para seleção da melhor dose do produto comercial a ser utilizada. De fato, a determinação da dose mais adequada do produto para a produtividade de estévia, considerando respostas diferentes para as variáveis analisadas, deve relacionar a produção de biomassa com os teores de glicosídeos diterpênicos.

As respostas para produtividades de rebaudiosídeo A e esteviosídeo apresentaram ajuste quadrático em relação às doses do fertilizante de liberação controlada (Figura 3D e 3E). As doses de máxima eficiência técnica foram próximas para os dois metabólitos:  $625,04 \text{ mg dm}^{-3}$  do fertilizante para o esteviosídeo e  $640,17 \text{ mg dm}^{-3}$  para o rebaudiosídeo A. Os resultados observados corroboram com os de Mandal *et al.* (2013) que destacam o fato de que um pequeno aumento na concentração de um metabolito secundário em combinação com maior acúmulo de biomassa pode aumentar substancialmente o rendimento de plantas.

É possível afirmar que o fertilizante de liberação lenta, em doses adequadas, supriu as necessidades metabólicas das plantas de estévia, mostrando incremento nas variáveis produtivas e fisiológicas avaliadas. É conveniente ressaltar, no entanto, que as maiores produtividades observadas devem estar associadas a uma viabilidade econômica. Segundo Scivittaro *et al.* (2004) a principal desvantagem dos fertilizantes de liberação lenta ou controlada é o custo superior às fontes solúveis, fazendo-se fundamental, portanto, a adequação das doses nos diferentes sistemas de produção, visando a otimizar o uso do insumo e garantir a produção econômica.

Em trabalho realizado por Rossa *et al.* (2013a) relatou-se que o fertilizante Basacote® 6M possuía valor comercial cerca de 20 vezes superior ao fertilizante solúvel NPK 5-15-10. Os autores reiteram, contudo, que em função do aumento da eficiência da adubação é possível reduzir significativamente a dose aplicada, e consequentemente, o volume de material a ser transportado e armazenado, a utilização de mão de obra e equipamentos e mitigar os impactos ambientais. Estes aspectos em conjunto com os possíveis efeitos do fertilizante no incremento da qualidade das plantas produzidas pode tornar a aplicação do produto viável técnica e economicamente (ROSSA *et al.*, 2013a).

#### 6.4 CONCLUSÕES

O fertilizante de liberação controlada influencia positivamente o crescimento e produtividade de *Stevia rebaudiana*, em doses adequadas. A disponibilidade contínua de nutrientes ao longo do ciclo da planta estimula o crescimento e acúmulo de glicosídeos diterpênicos na espécie.

Recomenda-se a utilização de doses entre 625,04 e 640,17 mg dm<sup>-3</sup> do Basacote® Mini 6M, correspondentes às doses de máxima eficiência técnica para produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, respectivamente no genótipo avaliado.

#### 6.5 REFERÊNCIAS

ANKIT. Global Stevia / *Stevia rebaudiana* Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography. IndustryARC, 2014.

BARBET-MASSIN, C.; GIULIANO, S.; ALLETTTO, L.; DAYDÉ, J.; BERGER, M. Nitrogen Limitation Alters Biomass Production but Enhances Steviol Glycoside Concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **PLoS One**, v.10, n.7, p. 1 – 16, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0133067.

BERGMANN, W (Ed.). **Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis**. New York: Gustav Fischer Publishing House Jena. 2. ed. 1992. 741 p.

BIDABADI, S. S.; AFAZEL, M.; POODEH, S. D. The effect of vermicompost leachate on morphological, physiological and biochemical indices of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a soilless culture system. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 251-262, 2016. DOI: 10.1007/s40093-016-0135-5.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Comércio Exterior. **Programa AliceWeb**. 2017. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em 26/01/2017.

CAKMAK, I.; YAZICI, A.M. Magnesium: a forgotten element in crop production. **Better Crops With Plant Food**, v. 94, n. 2, p. 23-25, 2010.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F. *et al.* (Ed.). **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2007. p.375-470.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. **Journal of Natural Products**, v 76, n.6, p. 1201–1228, 2013 c. DOI: 10.1021/np400203b.

CHAPIN III, F. Stuart. The mineral nutrition of wild plants. **Annual review of ecology and systematics**, v. 11, n. 1, p. 233-260, 1980. DOI: DOI: 10.1146/annurev.es.11.110180.001313.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBCS/NRS, 2004. 400p.

COMPO EXPERT. **Basacote® Mini**. Disponível em <<file:///C:/Users/Proprietario/Downloads/8.pdf>>. Acesso em 04 Out. 2015.

DELLA GUARDIA, M.D.; BENLLOCH, M. Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants. **Physiologia Plantarum**, v.49, n.4, p. 443 – 448, 1980. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1980.tb03332.x.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, v.28, n.3 p.350-356, 1956. DOI: 10.1021/ac60111a017.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Planta, 2006. 401 p.

FAGERIA, V. D. Nutrient interações in crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.24, n.8, p.1269 – 1290, 2001. DOI: 10.1081/PLN-100106981.



FRANCISCO, F. **Acúmulo de biomassa, produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A e tolerância à geada e ao acamamento de acessos de *Stevia rebaudiana* Bert.** 2015. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015.

FREITAS, S. D. J.; CARVALHO, A. D.; BERILLI, S. D. S.; SANTOS, P. D.; MARINHO, C. S. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. especial, p. 672-679, 2011. DOI: 10.1590/S0100-29452011000500094.

GIORDANO, M.; PEZZONI, V.; HELL, R. Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2., p. 857 – 864, 2000.

GIRARDI, E.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Emprego de fertilizantes de liberação lenta na formação de pomares de citros. **Revista Laranja**, v.24, n.2, p.507-518, 2003.

GUARESCHI, R. F.; GAZOLLA, P. R.; PERIN, A.; SANTINI, J. M. K. Adubação antecipada na cultura da soja com superfosfato triplo e cloreto de potássio revestidos por polímeros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 643-648, 2011. DOI: 10.1590/S1413-70542011000400001.

HAGEMANN, R. H.; BELOW, F. Role of nitrogen metabolism in crop production. *In*: ABROL, Y.P. (Ed.), **Nitrogen in Higher Plants**. New York: John Wiley, 1990. p. 313-334.

HIKOSAKA, K.; TERASHIMA, I. A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C3 plants to sun and shade with respect to nitrogen use. **Plant, Cell & Environment**, v. 18, n. 6, p. 605-618, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1995.tb00562.x.

JAIN, P.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S. L. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 3, p. 315-319, 2009. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.08.015.

JARMA, A. J.; COMBATT, E. M.; CLEVES, J. A. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. **Agronomía Colombiana**, v. 28, n. 2, p.199 – 208, 2010.

KITAJIMA, K.; HOGAN, K. P. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 6, p. 857-865, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2003.01017.x.

KOLB, N.; HERRERA, J.L.; FERREYRA, D.J.; ULIANA, R.F. Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p 4538–4541, 2001.

LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; AH-HEN, K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n.3, p 1121–1132, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140.

LIANG, R.; LIU M. Preparation and Properties of a Double-Coated Slow-Release and Water-Retention Urea Fertilizer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.4, p. 1392-1398, 2006. DOI: 10.1021/jf052582f.

LIMA FILHO, O. F.; MALAVOLTA, E. Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1 - 2, p. 53 – 61, 1997. DOI: 10.1590/S0103-90161997000100008.

LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E; SENA, J.O.A.; CARNEIRO, J.W. Absorção e acumulação de nutrientes em estévia *Stevia rebaudiana* (bert.) berton: I. Macronutrientes. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1 – 2, p. 14-22, 1997a. DOI: 10.1590/S0103-90161997000100003.

LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E; SENA, J.O.A.; CARNEIRO, J.W. Absorção e acumulação de nutrientes em estévia *Stevia rebaudiana* (bert.) berton: II. Micronutrientes. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1 – 2, p. 23-30, 1997b. DOI: 10.1590/S0103-90161997000100004.

LOPES, J. F.; COELHO, F. C.; RANGEL, O. J. P.; RABELLO, W. S.; GRAVINA, G. A.; VIEIRA, H. D. Adubação foliar com níquel e molibdênio no feijoeiro comum cv. Ouro Vermelho. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 234 - 240, 2014. DOI: 10.1590/S0034-737X2014000200011.

MA, L.; SHI, Y. Effects of potassium fertilizer on physiological and biochemical index of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Energy Procedia**, v. 5, p. 581-586, 2011. DOI: 10.1016/j.egypro.2011.03.102.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F. Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S.; VITTI, G.C. (Ed.). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007. p.189 – 249.

MANDAL, S.; EVELINA, H.; GIRI, B.B.; SINGHA,V.P.; KAPOOR, R. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 187–194, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.07.003.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3.ed London: Elsevier, 2012. 643p

MELO, B.; MENDES, A.N.G.; GUIMARAES, P.T.G. Doses crescentes de fertilizantes de liberação lenta gradual na produção de mudas de cafeeiro. **Bioscience Journal**, v. 17, n. 1, p. 97 - 113, 2001.

MENDONÇA, V.; TOSTA, M. D. S.; MACHADO, J. R.; GOULART JÚNIOR, S. A. R.; TOSTA, J. D. S.; BISCARO, G. A. Fertilizante de liberação lenta na formação de mudas de maracujazeiro amarelo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 344-348, 2007. DOI: 10.1590/S1413-70542007000200012.

METIVIER, J.; VIANA, A.M. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, n. 6, p.1211–1222, 1979. DOI: 10.1093/jxb/30.6.1211.

MORAES, J. F. V.; DYNIA, J. F. Alterações nas características químicas e físico-químicas de um solo Gley Pouco Húmico sob inundação e após a drenagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 223-235, 1992.

PAGLIARINI, M. K.; CASTILHO, R. M. M.; ALVES, M. C. Influência de fertilizantes convencional e de liberação lenta no desenvolvimento de mudas de jequitibá (*Cariniana legalis*). **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.8, n.1, p.23-27, 2014.

PAL, P. K.; KUMAR, R.; GULERIA, V.; MAHAJAN, M.; PRASAD, R.; PATHANIA, V.; GILL, B. S.; SINGH, D.; CHAND, G.; SINGH, B.; SINGH, D.; AHUJA, P.S. Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant Biology**, v. 15, n. 67, p. 2 – 16, 2015 a. DOI: 10.1186/s12870-015-0457-x.

PAL, P. K.; MAHAJAN, M.; PRASAD, R.; PATHANIA, V.; SINGH, N.; AHUJA, P.S. Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 556–564, 2015 b. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.060.

PAL, P. K.; PRASAD, R.; PATHANIA, V. Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 17, p. 1526-1535, 2013. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.06.017.

PATIL, N. M. Biofertilizer effect on growth, protein and carbohydrate content in *Stevia rebaudiana* var Bertoni. **Recent Research in Science and Technology**, v. 2, n. 10, 2010.

RÉGENT INSTRUMENTS. **Win/MacRHIZO** pró v. 2002c. Reference. Régent Instruments Inc., Québec, Canada. 2004. 51p.

RÓS, A. B.; ARAÚJO, H. S.; NARITA, N.; TAVARES FILHO, J. Uso de fertilizante de liberação lenta na produção de mudas de batata-doce em bandeja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2667-2674, 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n6p2667.

ROSSA, U. B.; ANGELO, A. C.; NOGUEIRA, A. C.; BOGNOLA, I. A.; POMIANOSKI, D. J. W.; SOARES, P. R. C.; BARROS, L. T. S. Fertilização de liberação lenta no crescimento de mudas de paricá em viveiro. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 75, p. 227-234, 2013a. DOI: doi: 10.4336/2013.pfb.33.75.429.

ROSSA, U. B.; ANGELO, A. C.; BOGNOLA, I. A.; WESTPHALEN, D. J.; MILANI, J. E. Fertilizante de liberação lenta no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Floresta**, v. 45, n. 1, p. 85-96, 2015. DOI: 10.5380/rf.v45i1.31224.

ROSSA, U. B.; ANGELO, A. C.; NOGUEIRA, A. C.; REISSMAN, C.B.; GROSSI, F.; RAMOS, M.R. Fertilizante de liberação lenta no crescimento de mudas de *Araucaria angustifolia* e *Ocotea odorifera*. **Floresta**, v. 41, n. 3, p. 491-500, 2011. DOI: 10.5380/rf.v41i3.24040.

ROSSA, U. B.; ANGELO, A. C.; NOGUEIRA, A. C.; WESTPHALEN, D. J.; BASSACO, M. V. M.; MILANI, J. E. DE F. BIANCHIN, J. E. Fertilizante de liberação lenta no desenvolvimento de mudas de *Schinus terebinthifolius* e *Sebastiania commersoniana*. **Floresta**, v. 43, n. 1, p. 93 – 104, 2013b. DOI: 10.5380/rf.v43i1.25690.

ROSSA, U. B.; ANGELO, A. C.; WESTPHALEN, D. J.; UTIMA, A.Y.; MILANI, J.C.E.; MONZANI, R.M.. Fertilizante de liberação lenta na produção de mudas de *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms. **Revista Agrocientífica**, v. 1, n. 1, p. 23-32, 2014.

SCIVITTARO, W. B.; OLIVEIRA, R. P. de; RADMANN, E. B. Doses de fertilizante de liberação lenta na formação do porta- enxerto 'Trifoliata'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 520-523, 2004. DOI: 10.1590/S0100-29452004000300035.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Comparison of means of agricultural experimentation data through different tests using the software Assistat. **African Journal of Agricultural Research**, v.37, n. 11, p.3527-3531, 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11523.

SILVA, L. S.; RANNO, S. K. Calagem em solos de várzea e a disponibilidade de nutrientes na solução do solo após o alagamento. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1054-1061, 2005. DOI: 10.1590/S0103-84782005000500011.

SOUZA, M. S.; ALVES, S. S. V.; DOMBROSKI, J. L. D.; FREITAS, J. D. B.; AROUCHA, E. M. M. Comparação de métodos de mensuração de área foliar para a cultura da melancia. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 2, p. 241 – 245, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TAVARINI, S.; PAGANO, I.; GUIDI, L.; ANGELINI, L.G. Impact of nitrogen supply on growth, steviol glycosides and photosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 150, n. 5, p. 953-962, 2016. DOI: 10.1080/11263504.2014.993743.

TERASHIMA, I.; HIKOSAKA, K. Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, v. 18, n. 10, p. 1111-1128, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1995.tb00623.x.

TRENKEL, M.E. **Improving fertilizer use efficiency: controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture**. Paris: International Fertilizer Industry Association, 1997. 151p.

WU, L.; LIU, M. Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 2, p. 240-247, 2008. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.08.020.

YADAV, A. K.; SINGH, S.; DHYANI, D.; AHUJA, P. S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n.1, p. 1–27, 2011. DOI: 10.4141/cjps10086.

ZAHRANI, S. Utilization of polyethylene and paraffin waxes as controlled delivery systems for different fertilizers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v.39, n.3, p.367–371, 2000. DOI: 10.1021/ie980683f.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, o genótipo estudado respondeu às práticas de manejo, no entanto, as produções de biomassa e glicosídeos de esteviol, especialmente de rebaudiosídeo A, ficaram abaixo do esperado, em função, principalmente, de condições ambientais adversas.

Maiores densidades de plantio são recomendadas em função de compensarem, pelo número elevado de plantas por unidade de área, os maiores teores de glicosídeos de esteviol e biomassa individuais de plantas em densidades menores. Em função do reduzido desenvolvimento vegetativo das plantas, os espaçamentos apresentaram pouca influência na plasticidade fenotípica do acesso avaliado ao longo do perfil. Foi possível verificar, no entanto, que a presença de tricomas não foi um indicativo da produtividade de glicosídeos de esteviol. O padrão de distribuição dos metabólitos ao longo do perfil da planta, semelhante ao relatado na literatura para plantas submetidas a condições de dias curtos, permite inferir que o plantio tardio tenha reduzido o ciclo da cultura pelo estímulo precoce do florescimento. Este fato está associado às menores produtividades de biomassa e glicosídeos de esteviol.

A época de colheita foi o fator que apresentou maior influência nos teores de substâncias edulcorantes. A colheita no início do florescimento apresentou maiores teores e produtividades de glicosídeos diterpênicos, confirmando o observado na literatura. A colheita no momento adequado é, portanto, um dos fatores com maior potencial para determinar a produtividade e viabilidade econômica no cultivo de estévia.

Quanto ao fertilizante de liberação controlada, é possível afirmar que exerceu influência positiva sobre o crescimento e produtividade de *Stevia rebaudiana* em doses adequadas, demonstrando potencial para suprir as demandas metabólicas do genótipo avaliado. A disponibilidade contínua de nutrientes ao longo do ciclo da planta estimulou o crescimento e acúmulo de glicosídeos diterpênicos. É conveniente ressaltar, no entanto, que doses excessivamente altas provocam inibição do crescimento, provavelmente devido ao excesso de potássio que prejudica a absorção de outros nutrientes essenciais.

Recomenda-se a utilização de doses entre 625,04 e 640,17 mg dm<sup>-3</sup> do Basacote® Mini 6M, correspondentes às doses de máxima eficiência técnica para produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, respectivamente.

O fertilizante de liberação controlada demonstra potencial para utilização em cultivos de estêvia como uma alternativa eficiente para redução de perdas de nutrientes, especialmente nitrogênio e potássio, por lixiviação. O alto custo destes fertilizantes, no entanto, faz necessário um estudo da viabilidade econômica antes de sua aplicação.

Além dos resultados obtidos diretamente pelos experimentos, observações foram realizadas em aspectos gerais do desenvolvimento do genótipo e da produção das mudas. Nas condições climáticas da região metropolitana de Curitiba o plantio em novembro reduz sobremaneira a produção de biomassa na espécie em função da redução do ciclo. O plantio em setembro permitiria, além de ciclo de desenvolvimento mais longo e consequente maior acúmulo de biomassa, uma segunda colheita, considerando que o genótipo apresentou alta porcentagem de rebrota.

Não foram observados problemas fitossanitários com pragas e doenças, todavia a infestação por ervas daninhas, especialmente monocotiledôneas, apresentou-se como uma das maiores dificuldades para o manejo. Recomendam-se aplicações de herbicidas antes do plantio para permitir maior desenvolvimento das plantas nas fases iniciais ou utilização de cobertura morta.

A morfologia do acesso estudado é suscetível ao acamamento e dificulta o controle de ervas daninhas por capina. A prática de amontoa pode contribuir neste aspecto, fornecendo maior sustentação e auxiliando no maior crescimento e desenvolvimento radicular/radical.

A produção das mudas por micropropagação mostrou-se extremamente viável, com mais de 90% de sobrevivência dos explantes na aclimação. Todavia o alto custo e necessidade de equipamentos específicos para a esta técnica restringem a disponibilidade de mudas. Nesse sentido, objetivando a maior viabilidade de plantios comerciais, recomendam-se estudos referentes à propagação da espécie via estaquia caulinar.

Ainda sobre a produção de mudas por micropropagação, apesar do índice de sobrevivência elevado, observou-se um crescimento lento das mudas utilizando apenas substratos comerciais. Testes com incorporação de fertilizante de liberação

controlada no substrato utilizado para aclimação mostrou resultados promissores, com incrementos substanciais em altura e diâmetro de caule. São, portanto, recomendados estudos com a nutrição de mudas, uma vez que um maior desenvolvimento das plantas na ocasião do plantio possui influência decisiva na sobrevivência, produtividade e competição com plantas daninhas.



## REFERÊNCIAS

- ABOU-ARAB, A.; AZZA, A.; FERIAI, M. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. **African Journal of Food Science**, v. 4, n.5, p. 269–281, 2010.
- AHMED, B.; HOSSAIN, M.; ISLAM, R.; SAHA, A. K; MANDAL, A. A review on natural sweetener plant – *Stevia* having medicinal and commercial importance. **Agronomski Glasnik**, v 1. p. 75-92, 2011.
- ANDOLFI, L.; MACCHIA, M.; CECCARINI, L. Agronomic productive Characteristics of Two Genotype of *Stevia rebaudiana* in Central Italy. **Italian Journal of Agronomy**, v. 73, n. 2, p. 257-262, 2006.
- ANKIT. Global *Stevia* / *Stevia rebaudiana* Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography. IndustryARC, 2014.
- BARRIOCANAL, L.A.; PALACIOS, M.; BENITEZ, G.; BENITEZ, S.; JIMENEZ, J.T.; JIMENEZ, N.; ROJAS, V. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 51, n.1, p. 37 – 41, 2008. DOI: 10.1016/j.yrtph.2008.02.006.
- BERNAL, J.; MENDIOLA, J.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Advanced analysis of nutraceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n.4, p. 758–774, 2011. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.11.033.
- BERTONI, M. S. Le Kaa` He-e´ Sa nature et ses proprietes. **Anales Cientificos Paraguayos**, v 5, n.1, p. 1 – 14, 1905.
- BONDAREV, N.I.; SUKHANOVA, M.A.; RESHETNYAK, O.V.; NOSOV, A. M. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny, **Biologia Plantarum**, v. 47, n.2, p. 261–264, 2003. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000022261.35259.4f.
- BONDAREV, N. I; SUKHANOVA, M.A.; SEMENOVA, G.A.; GORYAEVAC, O. V.; ANDREEVAC, S.E.; NOSOV, A. M. Morphology and Ultrastructure of Trichomes of Intact and In Vitro Plants of *Stevia Rebaudiana* Bertoni with Reference to Biosynthesis and Accumulation of Steviol Glycosides. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 65, n.1, p. 12–16, 2010. DOI: 10.3103/S0096392510010037.
- BOONKAEWWAN, C.; TOSKULKAO, C.; VONGSAKUL, M. Anti-Infl ammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells.

**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.3, p.785–789, 2006. DOI: 10.1021/jf0523465.

BRANDLE, J. E.; ROSA, N.. Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 72, n.4, p. 1263–1266, 1992.

BRANDLE, J. E.; STARRATT, A. N.; GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 78, n.4, p. 527–536, 1998. DOI: 10.4141/cjps10086.

BRANDLE, J. E.; TELMER, P. Steviol glycoside biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 68, n.14, p. 1855-1863, 2007. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.02.010.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. Ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 2010. 904 p.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Comércio Exterior. **Programa AliceWeb**. 2017. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em 26/01/2017.

CAETANO, M. **Estévia avança no Brasil e turбина mercado de adoçantes naturais**. Globo Rural, 10 jan. 2011. Caderno 291. Disponível em <<http://revistagloborural.globo.com/revista/common/0,,emi200089-18077,00-estevia+avanca+no+brasil+e+turbina+mercado+de+adocantes+naturais.html>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

CAPONIO, I.; TORRES, S. C.; ANDERSSON, G.; NORRMANN, G. A. Aspects of reproductive biology of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae). **Bonplandia**, v. 25, n. 1, p. 59-71, 2016.

CARAKOSTAS, M.C.; CURRY, L.L.; BOILEAU, A.C.; BRUSICK, D.J. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, supl. 7, p. 1 – 10, 2008. DOI: 10.1016/j.fct.2008.05.003.

CARNEIRO, J. W. P.; MUNIZ, A. S.; GUEDES, T. A. Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 77, n.3, p. 473–474, 1997. DOI: 10.4141/P96-166.

CARVALHO, M. A. M.; ZAIDAN, L. B. P. Obtenção de estacas de *Stevia rebaudiana* através de estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 201-206, 1995.

CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; SOARES, A.M.; MELO, H.C.; BERTALUCCI, S.K.V.; VIEIRA, C.V.; JÚNIOR, E.C.L. Adaptações anatômicas de folhas de *Mikania*

*glomerata* Sprengel (Asteraceae), em três regiões distintas da planta, em diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.2, p.8-16, 2007.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Glucose, sucrose, and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. **Biologia Plantarum**, v.57, n. 2, p. 390–394, 2013a. DOI: 10.1007/s10535-012-0289-6.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Plant Science**, v. 198, p. 72-82, 2013b. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.10.003.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. **Journal of Natural Products**, v 76, n.6, p. 1201–1228, 2013c. DOI: 10.1021/np400203b.

CEUNEN, S.; WERBROUCK, S.; GEUNS, J. M. C. Stimulation of steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* by red LED light. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n.7, p. 749 – 752, 2012. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.01.006.

CHOUDHARY, K.; BANDYOPADHYAY, N. Preliminary studies on the inorganic constituents of some indigenous hyperglycaemic herbs on oral glucose tolerance test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n.2, p. 179–184, 1999.

CORREA, C. R. B.; SÁNCHEZ, M. S.; PELARZA, D. F. Evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de estevia en condiciones del Valle del Cauca. **Acta Agronómica**, v. 56, n. 3, p. 131-134, 2008.

CRUZ, M. M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una Revisión. **Cultivos Tropicales**, V. 36, p. 5-15, 2015.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. **EFSA Journal**, v. 8, n. 4, p. 1-84, 2010.

FIRN, R.D.; JONES, C.G. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. **Natural Product Reports**, v. 20, n.4, p. 382-391, 2003. DOI: 10.1039/b208815k.

FUJITA, S. I.; TAKA, K.; FUJITA, Y. [Miscellaneous contributions to the essential oils of the plants from various territories. XLI. On the components of the essential oil of *Stevia rebaudiana* Bertoni (author's transl)]. **Yakugaku Zasshi**, v. 97, n. 6, p. 692 – 694, 1977.

GEUNS, J. Stevioside. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 913–921, 2003. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00426-6.

GOETTEMÖLLER, J.; CHING, A. Seed **germination in *Stevia rebaudiana***. In: J. Janick (ed.), **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999. p. 510–511.

GOTO, A.; CLEMENTE, E. Influência do rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n.1, p. 3 – 6, 1998.

HARADA, K.; MIYASAKI, T.; TAMURA, Y. Feeding Attraction Activity of Stevioside for Aquatic Animals. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 59, n.11, p. 1955-1955, 1993. DOI: 0.2331/suisan.59.1955.

HOLLIDAY, R. Plant population and crop yield. **Nature**, v. 186, n.4718, p.22– 24, 1960. DOI: 10.1038/186022b0.

HOSSAIN, M. A.; SIDDIQUE, A. B.; RAHMAN, S. M. M.; HOSSAIN, M. A. Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, n 2, p. 56 – 61, 2010.

JARMA, A. J.; COMBATT, E. M.; CLEVES, J. A. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. **Agronomía Colombiana**, v. 28, n. 2, p.199 – 208, 2010.

KALANDIA, A.; PAPUNIDZE G.; VANIDZE, M.; PAPUNIDZE, S. HPLC of *Stevia rebaudiana* Bertoni diterpene glycosides. **Bulletin of the Georgian Academy of Sciences**, v.169, n.1, p. 147-150, 2004.

KANG, K. H.; LEE, E.W. Physio-ecological studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni). **Korean Journal of Crop Science**, v. 26, n.1, p. 69 – 89, 1981.

KAUSHIK, R.; NARAYANAN, P.; VASUDEVAN, V.; MUTHUKUMARAN, G.; USHA, A. Nutrient Composition of Cultivated *Stevia* Leaves and the Influence of Polyphenols and Plant Pigments on Sensory and Antioxidant Properties of Leaf Extracts. **Journal of Food Science and Technology** , v. 47, n.1, p. 27–33, 2010. DOI: 10.1007/s13197-010-0011-7.

KINGHORN, D. A. **Stevia: The Genus *Stevia***. London and New York: Taylor & Francis, 2002. 215p.

KOCHIKYAN, V.T.; MARKOSYAN, A.A.; ABELYAN, L.A.; BALAYAN, A. M.; ABELYAN, V. A. Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 31 – 37, 2006. DOI: 10.1134/S0003683806010030.

KOVYLYAEVA, G. I.; BAKALEINIKI, G. A.; STROBYKINA, I. Y.; GUBSKAYA, V. I.; SHARIPOVA, R. R.; AL'FONSOV, V. A.; KATAEV, V. E.; TOLSTIKOV, A. G.

Glycosides from *Stevia rebaudiana*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 1, p. 81–85, 2007. DOI: 10.1007/s10600-007-0037-x.

KUMAR, H.; KAUL, K.; BAJPAI-GUPTA, S.; KAUL, V. K.; KUMAR, S. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Gene**, v. 492, n.1, p. 276-284, 2012. DOI: 10.1016/j.gene.2011.10.015.

KUMAR, R.; SHARMA, S.; SOOD, S. Yield components, light interception and marker compound accumulation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) affected by planting material and plant density under western Himalayan conditions. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n.12, p 1731–1745, 2014 a. DOI: 10.1080/03650340.2014.909029.

KUMAR, R.; SOOD, S.; SHARMA, S.; KASANA, R.C.; PATHANIA, V.L.; SINGH, B.; SINGH, R.D. Effect of plant spacing and organic mulch on growth, yield and quality of natural sweetener plant Stevia and soil fertility in western Himalayas. **International Journal of Plant Production**, v. 8, n. 3, p. 311-334, 2014 b.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 2.ed. New York: Springer, 2008. 610p.

LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; AH-HEN, K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n.3, p 1121–1132, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140.

LEWIS, W. H. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. **Economic Botany**, v. 46, p. 336–337, 1992.

LIANG, R.; LIU M. Preparation and Properties of a Double-Coated Slow-Release and Water-Retention Urea Fertilizer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.4, p. 1392-1398, 2006. DOI: 10.1021/jf052582f.

LIMA FILHO, O. F. **Análise Quantitativa do Crescimento da Estévia**. Documentos: 60. Durados: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste, 2004. 29p.

LIMA FILHO, O. F.; MALAVOLTA, E. Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1 - 2, p. 53 – 61, 1997. DOI: 10.1590/S0103-90161997000100008.

LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E; SENA, J.O.A.; CARNEIRO, J.W. Absorção e acumulação de nutrientes em estévia *Stevia rebaudiana* (bert.) bertonii: I. Macronutrientes. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1 – 2, p. 14-22, 1997 a. DOI: 10.1590/S0103-90161997000100003.

LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E; SENA, J.O.A.; CARNEIRO, J.W. Absorção e acumulação de nutrientes em estévia *Stevia rebaudiana* (bert.) bertonii: II. Micronutrientes. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1 – 2, p. 23-30, 1997 b. DOI: 10.1590/S0103-90161997000100004.

LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. **Sistemas de Produção 5: Estévia**. Dourados: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste, 2004. 55p.

MADAN, S. AHMAD, S.; SINGH, G. N.; KOHLI, K.; KUMAR, Y.; SINGH, R.; GARG, M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – A Review. **Indian Journal of Natural Products and Resources**. v. 1, n.3, p. 267–286, 2010.

MADORE, M. A. Synthesis and degradation of diterpene glycosides in source leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Plant Biology (Rockville)**, v. 129, 2000.

MANDAL, S.; EVELINA, H.; GIRI. B.B.; SINGHA,V.P.; KAPOOR, R. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 187–194, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.07.003.

MARCINEK, K.; KREJPCIO, Z. *Stevia rebaudiana* Bertoni – Chemical composition and functional properties. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v.14, n. 2, p. 145 – 152, 2015. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.2.16.

MARTINI, A.; TAVARINI, S.; MACCHIA, M.; BENELLI, G.; CANALE, A.; ROMANO, D.; ANGELINI, L. G. Influence of insect pollinators and harvesting time on the quality of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni seeds. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing With All Aspects Of Plant Biology**, v. 1, n.1, p. 1-11, 2016. DOI: 10.1080/11263504.2016.1174173.

METIVIER, J.; VIANA, A.M. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, n. 6, p.1211–1222, 1979. DOI: 10.1093/jxb/30.6.1211.

MISHRA, P.; SINGH R.; KUMAR U.; PRAKASH V. *Stevia rebaudiana* – A magical sweetener. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 5, n.1, p. 62–74, 2010.

MONTEIRO, W. R.; CASTRO, M. M.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C.; MAHLBERG, P. G. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. - Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 3, p. 349-357, 2001. DOI: 10.1590/S0100-84042001000300013.

MORAES, R. M.; DONEGA, M. A.; CANTRELL, C.L.; McCHESNEY, J.D. Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 385-389. 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.09.025.

NANAYAKKARA, N.P.; KLOCKE, J.A.; COMPADRE, C.M.; HUSSAIN, R.A.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Characterization and feeding deterrent effects on the aphid, *Schizaphis graminum*, of some derivatives of the sweet compounds, stevioside and rebaudioside A. **Journal of Natural Products**, v. 50, n.3, p. 434 – 44, 1987. DOI: 10.1021/np50051a015.

NASSAR, A.M.; BESHEIT, S.Y.; ALLAM, A.I. Effect of sowing dates, harvesting dates and their interaction on yield and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.)Bertoni) in Egypt. **Egyptian Journal of Applied Science**, v.16, p. 442–459, 2001.

OHTA, M.; SASA, S.; INOUE, A.; TAMAI, T.; FUJITA, I.; MORITA, K.; MATSUURA, F. Characterization of novel steviol glycosides from leaves of *Stevia rebaudiana* Morita. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 57, n. 3, p. 199-209, 2010.

ÖZYİĞİTİ, Y.; UÇAR, E.; TURGUT, K. The Effect of Different Pollination Methods on Seed Yield and Germination Features in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Turkish Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 114 – 117, 2015.

PAL, P. K.; KUMAR, R.; GULERIA, V.; MAHAJAN, M.; PRASAD, R.; PATHANIA, V.; GILL, B. S.; SINGH, D.; CHAND, G.; SINGH, B.; SINGH, D.; AHUJA, P.S. Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant Biology**, v. 15, n. 67, p. 2 – 16, 2015 a. DOI: 10.1186/s12870-015-0457-x.

PAL, P. K.; MAHAJAN, M.; PRASAD, R.; PATHANIA, V.; SINGH, N.; AHUJA, P.S. Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 556–564, 2015 b. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.060.

PAL, P. K.; PRASAD, R.; PATHANIA, V. Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 17, p. 1526-1535, 2013. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.06.017.

PATIL, N. M. Biofertilizer effect on growth, protein and carbohydrate content in *Stevia rebaudiana* var Bertoni. **Recent Research in Science and Technology**, v. 2, n. 10, 2010.

PERICHE, A.; CASTELLÓ, M. L.; HEREDIA, A.; ESCRICHE, I. Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves. **Food Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 1-6, 2015. DOI: 0.1016/j.foodchem.2014.09.029.

RAMESH, K.; SINGH, V.; AHUJA, P. S. Production potential of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. under intercropping systems. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 53, n.4, p. 443–458, 2007. DOI: 10.1080/03650340701474949.

RAMESH, K.; SINGH, V.; MEGEJI, N. W. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. **Advances in Agronomy**, v. 89, p. 137 – 177, 2006. DOI: 10.1016/S0065-2113(05)89003-0.

RICHMAN, A.S.; GIJZEN, M.; STARRATT, A.N.; YANG, Z.; BRANDLE, J.E. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. **The Plant Journal**, v. 19, n. 4., p.411–421, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00531.x.

SAVITA, S.; SHEELA, K.; SUNANDA, S.; SHANKAR, A.; RAMAKRISHNA, P. *Stevia rebaudiana* – A functional component for food industry. **Journal of Human Ecology**, v.15, n.4, p.261–264, 2004

SERFATY, M.; IBDAH, M.; FISCHER, R.; CHAIMOVITSH, D.; SARANGA, Y.; DUDAI, N. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and Harvesting regimes. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 731-736, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.08.063.

SERIO, L. La *Stevia rebaudiana*, une alternative au sucre. **Phytothérapie**, v. 8, n.1, p. 26–32, 2010. DOI: 10.1007/s10298-010-0526-4.

SHOCK, C. C. Rebaudi's stevia: natural non-caloric sweeteners. **California Agriculture**, v. 36, p. 4-5, 1982.

SIDDIQUE, A. B.; RAHMAN, S. M. M.; HOSSAIN, M. A. Chemical composition of essential oil by different extraction methods and fatty acid analysis of the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Arabian Journal of Chemistry**, v. x, n. x, p. 1 – 5, 2012. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.01.004.

SIMLAT, M.; ŚLĘZAK, P.; MOŚ, M.; WARCHOŁ, M.; SKRZYPEK, E.; PTAK, A. The effect of light quality on seed germination, seedling growth and selected biochemical properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 295-304, 2016. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.09.009.

SINGH, K.; RANI, A.; KUMAR, S.; SOOD, P.; MAHAJAN, M.; YADAV, S.K.; SINGH, B. AHUJA, P.S. An early gene of the flavonoid pathway, flavanone 3-hydroxylase,



exhibits a positive relationship with the concentration of catechins in tea (*Camellia sinensis*). **Tree Physiology**, v. 28, n. 9, p. 1349 – 1356, 2008.

SINGH, S. D.; RAO, G. P. Stevia: The herbal sugar of the 21st century. **Sugar Technology**, v. 7, n. 1, p. 17-24. 2005. DOI: 10.1007/BF02942413.

SMITH, J.; VAN-STADIN, H. Subcellular pathway of glycoside synthesis. **South African Journal of Science**, v. 88, p.206 – 206, 1992.

SUMIDA, T. Reports on *Stevia rebaudiana* Bertoni M. introduced from Brazil as a new sweetness resource in Japan. **Miscellaneous publication of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station**, v. 2, p. 69–83, 1968.

TADHANI, M.; PATEL, V.; SUBHASH, R. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.4, p. 323–329, 2007. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.08.004.

TAKAHASHI, L; MELGES, E.; CARNEIRO, J. W. P. Desempenho germinativo de sementes de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 1, p. 1-5, 1996.

TAVARINI, S.; PAGANO, I.; GUIDI, L.; ANGELINI, L.G. Impact of nitrogen supply on growth, steviol glycosides and photosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 150, n. 5, p. 953-962, 2016. DOI: 10.1080/11263504.2014.993743.

TOTTÉ, N.; CHARON, L.; ROHMER, M.; COMPERNOLLE, F.; BABOEUF, I.; GEUNS, J.M.C. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. **Tetrahedron Letters**, v. 41, n.33, p. 6407–6410, 2000. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)01094-7.

TRENKEL, M.E. **Improving fertilizer use efficiency: controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture**. Paris: International Fertilizer Industry Association, 1997. 151p.

VALIO, I.F.M.; ROCHA, R.F. Effect of photoperiod and growth regulator on growth and flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 46, n. 2, p. 243-248, 1977. DOI: 10.1626/jcs.46.243.

WÖLWER-RIECK, U. The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 886–895, 2012. DOI: 10.1021/jf2044907.

YADAV, A. K.; SINGH, S.; DHYANI, D.; AHUJA, P. S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, v 91, n.1, p. 1–27, 2011. DOI: 10.4141/cjps10086.

YANG, Y.; HUANG, S.; HAN, Y.; YUAN, H.; GU, C.; WANG, Z. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.86, p.174-180, 2015. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.12.004.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Resumo da análise de variância para altura (ALT), número de ramificações (RAM) índice de área foliar (IAF), área foliar específica (AFE) razão de peso foliar (RPF) e razão de área foliar (RAF) em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio (D) e épocas de colheita (C). Pinhais/PR (2016).

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios					
		ALT	RAM	IAF	AFE	RPF	RAF
D	2	46,34 <sup>ns</sup>	60,36 <sup>ns</sup>	2,24 <sup>**</sup>	104,68 <sup>ns</sup>	0,009 <sup>ns</sup>	36,83 <sup>ns</sup>
C	2	1168,83 <sup>**</sup>	505,91 <sup>**</sup>	1,56 <sup>**</sup>	668,66 <sup>**</sup>	0,021 <sup>ns</sup>	220,76 <sup>**</sup>
Int (DXC)	4	11,87 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	45,86 <sup>ns</sup>	0,004 <sup>ns</sup>	15,85 <sup>ns</sup>
Blocos	3	35,43 <sup>ns</sup>	5,63 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>	386,60 <sup>*</sup>	0,013 <sup>ns</sup>	142,35 <sup>**</sup>
Resíduo D	6	35,23	20,85	0,09	43,79	0,007	13,16
Resíduo C	18	5,95	5,62	0,12	92,51	0,006	30,58
C.V. D (%)	-	10,61	26,50	30,35	28,74	16,03	27,60
C.V. C (%)	-	4,36	13,77	33,93	41,78	15,37	42,07

<sup>\*\*</sup>significativo a 1%; <sup>\*</sup>significativo a 5%; <sup>ns</sup>: não significativo; C.V.: Coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade; Int: Interação.

**Anexo 2.** Resumo da análise de variância para massa seca de folhas e massa seca de parte aérea por planta (MFP; MAP) e produtividades de massa seca de folhas e massa seca de parte aérea (MFH; MAH) em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio (D) e épocas de colheita (C). Pinhais/PR (2016).

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios			
		MFP	MAP	MFH	MAH
D	2	191,63 <sup>*</sup>	556,94 <sup>*</sup>	1057935,54 <sup>*</sup>	3167488,13 <sup>*</sup>
C	2	241,02 <sup>**</sup>	976,82 <sup>**</sup>	1267311,01 <sup>**</sup>	3841823,77 <sup>**</sup>
Int (DXC)	4	30,38 <sup>ns</sup>	642,02 <sup>ns</sup>	63882,64 <sup>ns</sup>	526237,09 <sup>*</sup>
Blocos	3	21,48 <sup>ns</sup>	113,01 <sup>ns</sup>	138871,41 <sup>ns</sup>	491449,66 <sup>ns</sup>
Resíduo D	6	20,24	74,58	181758,24	380744,23
Resíduo C	18	22,49	34,89	102732,82	135991,39
C.V. D(%)	-	43,16	44,12	52,90	43,07
C.V. C (%)	-	45,48	29,50	39,77	25,74

<sup>\*\*</sup>significativo a 1%; <sup>\*</sup>significativo a 5%; <sup>ns</sup>: não significativo; C.V.: Coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade; Int: Interação.

**Anexo 3.** Resumo da análise de variância para teor de clorofila A (CLA), clorofila B (CLB), clorofila total (CLT), relação de clorofila A e B(RAB), proteínas totais (PRO) e Açúcares totais (ACU) em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio (D) e épocas de colheita (C). Pinhais/PR (2016).

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios					
		CLA	CLB	CLT	RAB	PRO	ACU
D	2	0,0008 <sup>**</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>	0,00136 <sup>*</sup>	0,0480 <sup>ns</sup>	61,42 <sup>ns</sup>	21779,78 <sup>ns</sup>
C	2	0,0005 <sup>ns</sup>	0,00003 <sup>ns</sup>	0,0008 <sup>ns</sup>	0,0260 <sup>ns</sup>	1187,35 <sup>**</sup>	21004,62 <sup>*</sup>
Int (DXC)	4	0,0004 <sup>ns</sup>	0,0002 <sup>ns</sup>	0,0010 <sup>ns</sup>	0,0210 <sup>ns</sup>	204,01 <sup>ns</sup>	7111,23 <sup>ns</sup>
Blocos	3	0,0006 <sup>**</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>	0,0127 <sup>*</sup>	0,0883 <sup>ns</sup>	345,99 <sup>ns</sup>	81588,62 <sup>**</sup>
Resíduo D	6	0,00003	0,00005	0,0001	0,1792	114,51	7073,83
Resíduo C	18	0,0003	0,00008	0,0006	0,1016	131,79	5362,58
C.V. D(%)	-	7,57	10,27	13,56	21,03	21,14	19,83
C.V. C (%)	-	21,85	21,54	22,46	15,83	22,68	17,27

<sup>\*\*</sup>significativo a 1%; <sup>\*</sup>significativo a 5%; <sup>ns</sup>: não significativo; C.V.: Coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade; Int: Interação.

**Anexo 4.** Resumo da análise de variância para teores de esteviosídeo (EST), rebaudiosídeo A (REB), relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo (RAE) e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A (PES; PRA) em *Stevia rebaudiana* cultivada em diferentes densidades de plantio (D) e épocas de colheita (C). Pinhais/PR (2016).

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios				
		EST	REB	RAR	PES	PRA
D	2	1008,41**	560,11**	0,0159*	1778,88**	334,55**
C	2	1202,50**	412,66**	0,0507**	2167,37**	1015,78**
Int (DXC)	4	432,74**	125,33**	0,0131**	112,09 <sup>ns</sup>	150,93**
Blocos	3	106,73 <sup>ns</sup>	10,76 <sup>ns</sup>	0,0034 <sup>ns</sup>	116,61 <sup>ns</sup>	34,35 <sup>ns</sup>
Resíduo D	6	68,31	33,36	0,0021	25,63	36,63
Resíduo C	18	51,77	21,94	0,0014	25,69	31,26
C.V. D(%)	-	13,81	20,50	9,79	17,05	23,86
C.V. C (%)	-	12,02	16,63	8,08	22,53	23,89

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; <sup>ns</sup>: não significativo; C.V.: Coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade; Int: Interação.

**Anexo 5.** Resumo da análise de variância para massa seca de folhas e massa seca de parte aérea por planta (MFP; MAP) e produtividades de massa seca de folhas e massa seca de parte aérea (MFH; MAH) em três segmentos (S) de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos (E). Pinhais/PR (2016).

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios			
		MFP	MAP	MFH	MAH
E	2	68,24**	167,27**	99124,54**	676283,05**
S	2	88,02**	10,67 <sup>ns</sup>	443245,25**	36312,11 <sup>ns</sup>
Int (EXS)	4	9,27**	1,36 <sup>ns</sup>	8026,97 <sup>ns</sup>	13693,38 <sup>ns</sup>
Blocos	3	7,75*	14,71*	23733,24 <sup>ns</sup>	93868,04*
Resíduo	24	2,00	4,56	8676,20	25093,45
C.V. (%)	-	31,21	23,65	28,36	23,04

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; <sup>ns</sup>: não significativo; C.V.: Coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade; Int: Interação.

**Anexo 6.** Resumo da análise de variância para altura índice de área foliar (IAF), área foliar específica (AFE), razão de peso foliar (RPF) e razão de área foliar (RAF) em três segmentos (S) de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos (E). Pinhais/PR (2016).

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios			
		IAF	AFE	RPF	RAF
E	2	0,43**	18,08**	0,038*	14,38*
S	2	0,89**	14,85**	0,700**	138,71**
Int (EXS)	4	0,07**	6,87 <sup>ns</sup>	0,001*	4,59 <sup>ns</sup>
Blocos	3	0,04*	3,52 <sup>ns</sup>	0,042**	7,04 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,01	2,53	0,008	3,15
C.V. (%)	-	25,81	19,39	18,01	30,74

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; <sup>ns</sup>: não significativo; C.V.: Coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade; Int: Interação.

**Anexo 7.** Resumo da análise de variância para espessura de parênquimas lacunoso (EPL) e paliçádico (EPP), espessura total do limbo foliar (ETL) e porcentagem relativa de parênquima paliçádico no limbo (PRP) em três segmentos (S) de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos (E). Pinhais/PR (2016).

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios			
		ETL	EPP	EPL	PRP
E	2	277,39 <sup>ns</sup>	85,23 <sup>ns</sup>	22,29 <sup>ns</sup>	3,88 <sup>ns</sup>
S	2	5352,68**	546,53**	3826,93**	43,66**
Int (EXS)	4	973,39**	206,57**	510,58*	1,97 <sup>ns</sup>
Blocos	3	178,08 <sup>ns</sup>	26,01 <sup>ns</sup>	106,56 <sup>ns</sup>	0,83 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	139,55	37,93	152,43	4,28
C.V. (%)	-	3,62	4,72	8,10	5,16

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; <sup>ns</sup>: não significativo; C.V.: Coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade; Int: Interação.

**Anexo 8.** Resumo da análise de variância para teores de esteviosídeo (EST), rebaudiosídeo A (REB), relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo (RAE) e produtividades de esteviosídeo e rebaudiosídeo A (PES; PRA) em três segmentos (S) de plantas de *Stevia rebaudiana* cultivadas em diferentes espaçamentos (E). Pinhais/PR (2016).

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios				
		EST	REB	RAE	PES	PRA
E	2	587,31**	289,90**	0,011 <sup>ns</sup>	75,46 <sup>ns</sup>	9,89 <sup>ns</sup>
S	2	1741,81**	158,68*	0,041**	916,11**	228,39**
Int (EXS)	4	87,08 <sup>ns</sup>	189,88**	0,053**	4,38 <sup>ns</sup>	13,46 <sup>ns</sup>
Blocos	3	27,79 <sup>ns</sup>	32,18 <sup>ns</sup>	0,009 <sup>ns</sup>	33,95 <sup>ns</sup>	7,12 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	76,65 <sup>ns</sup>	28,68	0,006	34,45	5,43
C.V. (%)	-	18,47	23,39	15,87	37,98	31,84

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; <sup>ns</sup>: não significativo; C.V.: Coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade; Int: Interação.

**Anexo 9.** Resumo da análise de variância para teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas de *Stevia rebaudiana* em função de doses de fertilizante de liberação controlada. Curitiba/PR (2016).

Quadrados médios						
Fontes de Variação	G.L.	N	P	K	Ca	Mg
g kg <sup>-1</sup>						
Tratamentos	5	1,407	0,027	545,33	2,823	2,500
Ajuste linear	1	0,008 <sup>ns</sup>	0,128 <sup>**</sup>	1773,63 <sup>**</sup>	2,346 <sup>*</sup>	7,012 <sup>**</sup>
Ajuste quadrático	1	1,625 <sup>ns</sup>	0,0004 <sup>ns</sup>	246,14 <sup>**</sup>	4,09 <sup>**</sup>	1,94 <sup>**</sup>
Resíduo	18	4,359	0,021	22,341	0,416	0,185
CV (%)		8,81	4,77	19,35	7,12	7,11
Média geral		23.69	0.73	24.42	9.06	6.04

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; ns: não significativo. C.V.: Coeficiente de Variação. G.L.: Graus de Liberdade.

**Anexo 10.** Resumo da análise de variância para teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em ramos de *Stevia rebaudiana* em função de doses de fertilizante de liberação controlada. Curitiba/PR (2016).

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados médios				
		N	P	K	Ca	Mg
		g kg <sup>-1</sup>				
Tratamentos	5	16,598	0,0099	159,64	0,877	3,792
Ajuste linear	1	76,354**	0,0199**	715,16**	2,288**	10,278**
Ajuste quadrático	1	0,110 <sup>ns</sup>	0,0229**	43,86 <sup>ns</sup>	1,912**	8,535**
Resíduo	18	99,437	0,0006	22,58	0,072	0,072
CV (%)		21,44	7,52	16,87	10,94	13,02
Média geral		10,96	0,35	28,17	2,45	2,05

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; ns: não significativo. C.V.: Coeficiente de Variação. G.L.: Graus de Liberdade.

**Anexo 11.** Resumo da análise de variância para conteúdo de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas de *Stevia rebaudiana* em função de doses de fertilizante de liberação controlada. Curitiba/PR (2016).

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados médios				
		N	P	K	Ca	Mg
		mg planta <sup>-1</sup>				
Tratamentos	5	29682,49	3,41	58775,59	851,21	307,04
Ajuste linear	1	2709,65**	10,46**	207997,4**	3909,07**	718,32**
Ajuste quadrático	1	914,04*	2,48*	4289,93 <sup>ns</sup>	2,80 <sup>ns</sup>	472,76**
Resíduo	18	447,35	0,38	1433,49	47,02	31,69
CV (%)		14,45	13,97	22,83	15,48	15,34
Média geral		146,35	4,39	165,81	44,30	36,71

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; ns: não significativo. C.V.: Coeficiente de Variação. G.L.: Graus de Liberdade.

**Anexo 12.** Resumo da análise de variância para conteúdo de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em ramos de *Stevia rebaudiana* em função de doses de fertilizante de liberação controlada. Curitiba/PR (2016).

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados médios				
		N	P	K	Ca	Mg
		mg planta <sup>-1</sup>				
Tratamentos	5	4907,92	1,45	34657,25	184,768	12,77
Ajuste linear	1	22100,4**	6,26**	154220,02**	872,61**	23,84 <sup>ns</sup>
Ajuste quadrático	1	115,15 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	3155,22 <sup>ns</sup>	0,33 <sup>ns</sup>	29,25 <sup>ns</sup>
Resíduo	18	738,426	0,35	4387,86	20,92	9,37
CV (%)		42,16	32,39	39,65	33,35	31,23
Média geral		64,45	1,83	167,07	13,72	9,80

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; ns: não significativo. C.V.: Coeficiente de Variação. G.L.: Graus de Liberdade.

**ANEXO 13.** Resumo da análise de variância para índices de eficiência de utilização de de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas de *Stevia rebaudiana* em função de doses de fertilizante de liberação controlada. Curitiba/PR (2016).

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados médios				
		N	P	K	Ca	Mg
		$g^2 g^{-1}$				
Tratamentos	5	23134,40	$4,36 \times 10^7$	32473,45	259289,50	663387,76
Ajuste linear	1	95747,13**	$2,03 \times 10^{8**}$	12350,37 <sup>ns</sup>	702336,53**	$3,01 \times 10^{6**}$
Ajuste quadrático	1	3669,69 <sup>ns</sup>	$2,79 \times 10^{6ns}$	69603,02**	299378,61**	213,87 <sup>ns</sup>
Resíduo	18	1915,21	$4,05 \times 10^6$	3682,96	17509,93	26006,02
CV (%)		16,61	14,97	21,26	15,04	15,15
Média geral		263,55	8822,20	285,39	879,58	1064,48

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; ns: não significativo. C.V.: Coeficiente de Variação. G.L.: Graus de Liberdade.

**Anexo 14.** Resumo da análise de variância para altura (Alt), número de ramificações (Ram), área foliar (Afl), massa seca de folhas (Msf) e massa seca total (Mst) em *Stevia rebaudiana* sob doses de fertilizante de liberação controlada. Curitiba/PR (2016).

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados médios				
		Alt (cm)	Ram (n)	Afl (cm <sup>2</sup> )	Msf (g)	Mst (g)
Tratamentos	5	70,71	10,54	187781,01	12,75	134,41
Ajuste linear	1	151,81*	35,18**	379793,24 <sup>ns</sup>	52,96**	587,51**
Ajuste quadrático	1	129,97*	10,74**	461112,45*	3,49*	22,88**
Resíduo	18	24,62	0,65	98687,91	0,62	1,52
CV (%)		13,35	7,68	34,64	12,74	8,03
Média geral		37,17	10,50	906,87	6,19	15,34

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; ns: não significativo. C.V.: Coeficiente de Variação. G.L.: Graus de Liberdade.

**Anexo 15.** Resumo da análise de variância para teores de clorofila *a* (CLA), clorofila *b* (CLB), clorofila total (CLT), relação clorofila *a/b* (RAB), proteínas (PRT) e açúcares totais (ACT) em folhas de *Stevia rebaudiana* em função de doses de fertilizante de liberação controlada. Curitiba/PR (2016).

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados médios					
		CLA	CLB	CLT	RAB	PRT	ACT
		(mg cm <sup>-2</sup> )				(mg g <sup>-2</sup> )	
Tratamentos	5	0,001	0,001	0,002	0,07	852,43	26032,99
Ajuste linear	1	0,001 <sup>ns</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>	0,003 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	1046,79*	74,97 <sup>ns</sup>
Ajuste quadrático	1	0,0008 <sup>ns</sup>	0,00001 <sup>ns</sup>	0,0007 <sup>ns</sup>	0,23*	20,94 <sup>ns</sup>	14889,50 <sup>ns</sup>
Resíduo	18	0,001	0,00025	0,002	0,05	164,46	17541,65
CV (%)		11,77	11,98	11,09	9,29	16,04	24,06
Média geral		0,30	0,13	0,44	2,31	79,92	550,54

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; ns: não significativo. C.V.: Coeficiente de Variação. G.L.: Graus de Liberdade.

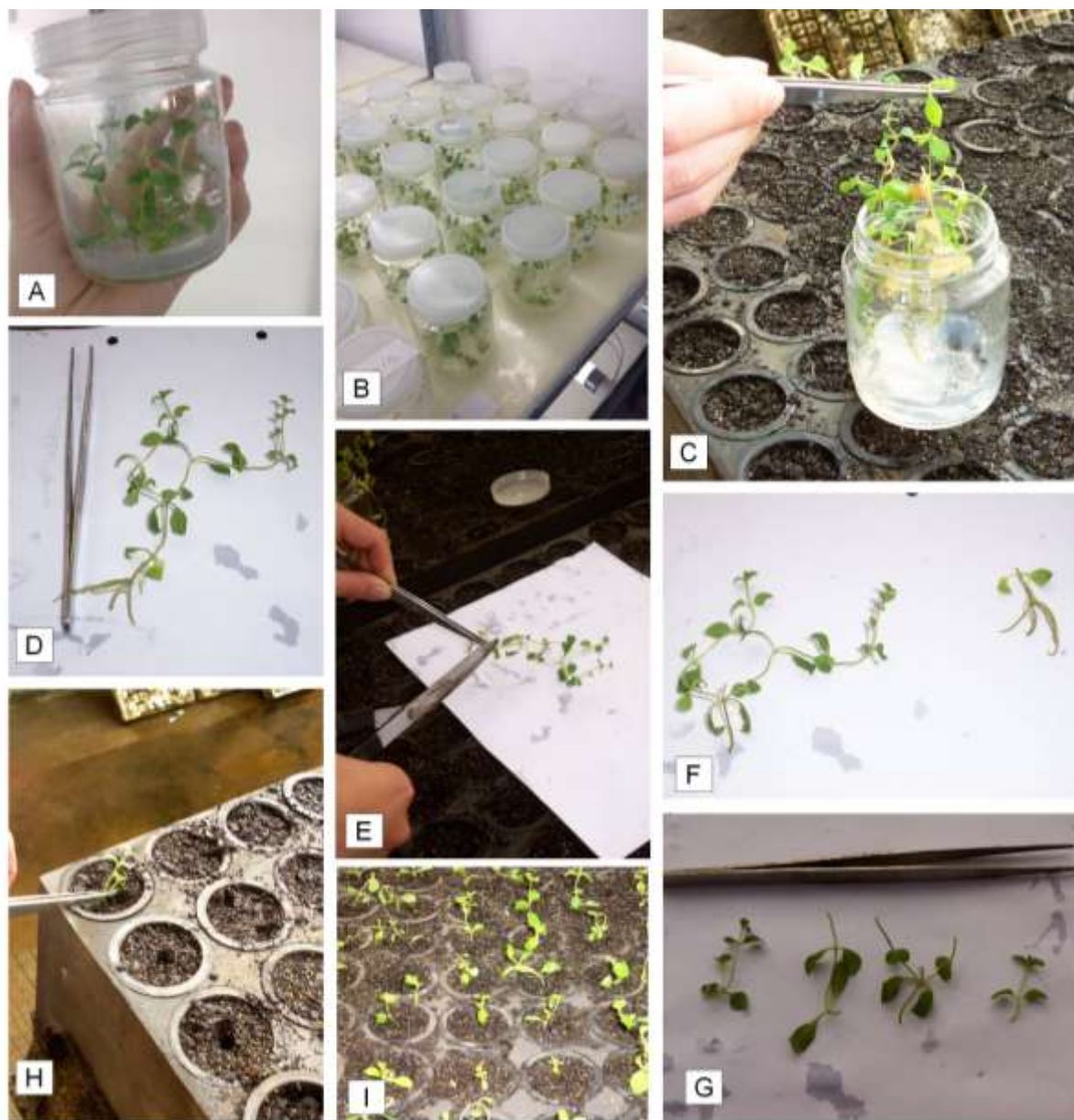
**Anexo 16.** Resumo da análise de variância para teores de esteviosídeo (EST) e rebaudiosídeo A (REB), relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo (RAE), e produtividades de esteviosídeo (PES) e rebaudiosídeo A (PRA) em *Stevia rebaudiana* sob doses de fertilizante de liberação controlada. Curitiba/PR (2016).

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados médios				
		EST	REB	RAE	PES	PRA
		(mg cm <sup>-2</sup> )			(mg g <sup>-2</sup> )	
Tratamentos	5	287,50	144,84	0,014	126338,79	28338,17
Ajuste linear	1	461,48**	110,98**	0,0003 <sup>ns</sup>	458383,42**	96957,72**
Ajuste quadrático	1	748,33**	506,15**	0,017*	85229,57**	32735,53**
Resíduo	18	22,09	9,23	0,003	4800,91	1426,74
CV (%)		5,88	8,00	11,65	13,74	15,74
Média geral		79,88	37,96	0,48	504,19	279,99

\*\*significativo a 1%; \*significativo a 5%; ns: não significativo. C.V.: Coeficiente de Variação. G.L.: Graus de Liberdade.



**Anexo 17.** Fotografias do processo de produção de mudas *Stevia rebaudiana* por micropropagação. Curitiba/PR (2016). A e B: plantas cultivadas *in vitro* em sala de crescimento. C e D: Retirada das plantas dos vidros para aclimação em casa de vegetação com nebulização intermitente. E e F: Separação da raiz, segmento descartado, com auxílio de tesoura. G: Segmentos caulinares prontos para plantio. H: plantio dos explantes em substrato comercial com auxílio de pinça. I: Aspecto dos explantes momentos após o plantio.



Fotos: Arquivo pessoal do autor.

**Anexo 18.** Enraizamento de explantes de *Stevia rebaudiana* obtidos por micropropagação aos sete dias após o plantio (A) e mudas nos tubetes 45 dias após o plantio (B). Curitiba/PR, 2016.



Fotos: Arquivo pessoal do autor.

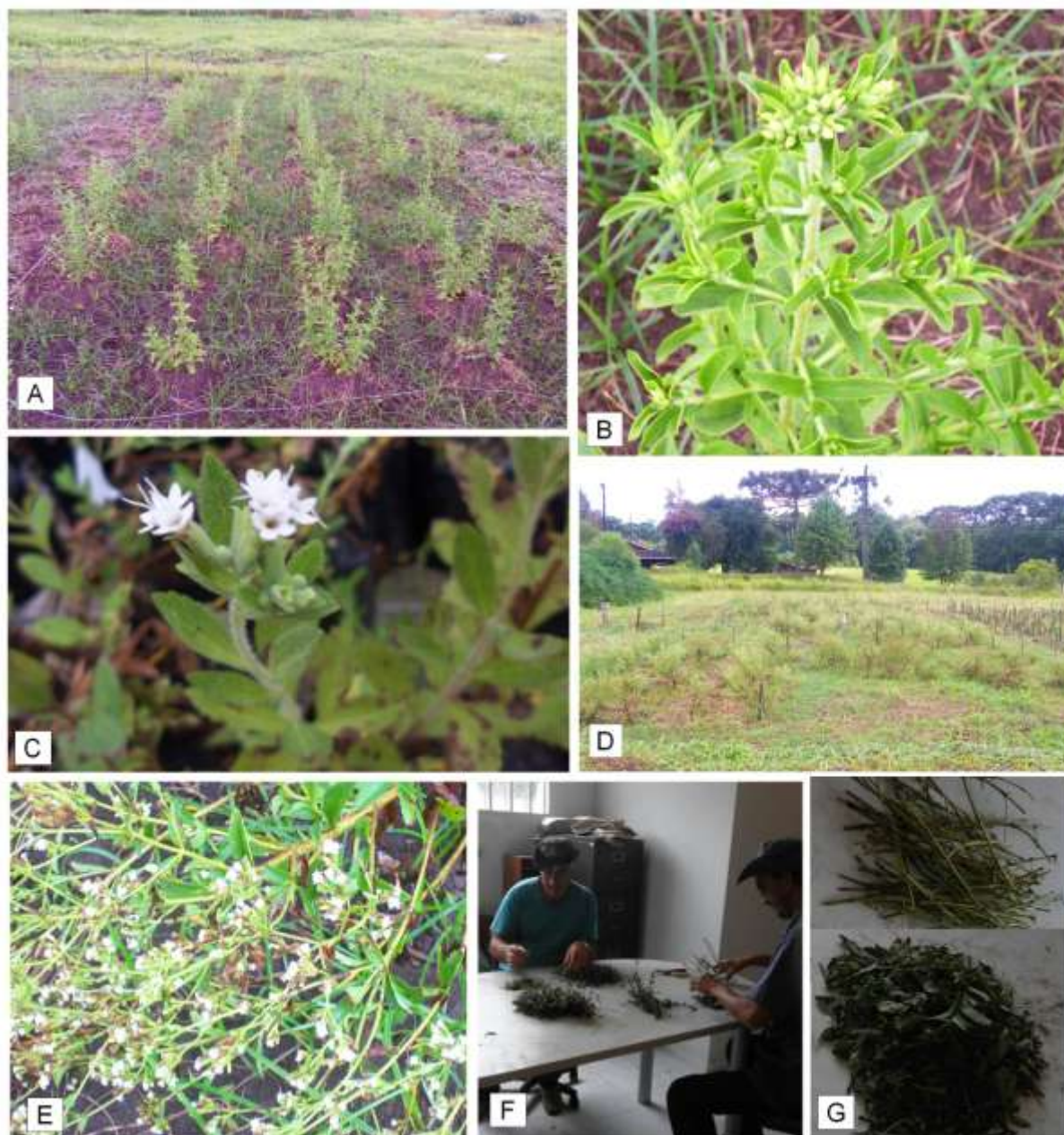


**Anexo 19.** Instalação do experimento com densidades de plantio e épocas de colheita. A e B: demarcação da área experimental. D: coveamento. C e E: Panorama do experimento logo após o plantio das mudas. Pinhais/PR (2015).



Fotos: Arquivo pessoal do autor.

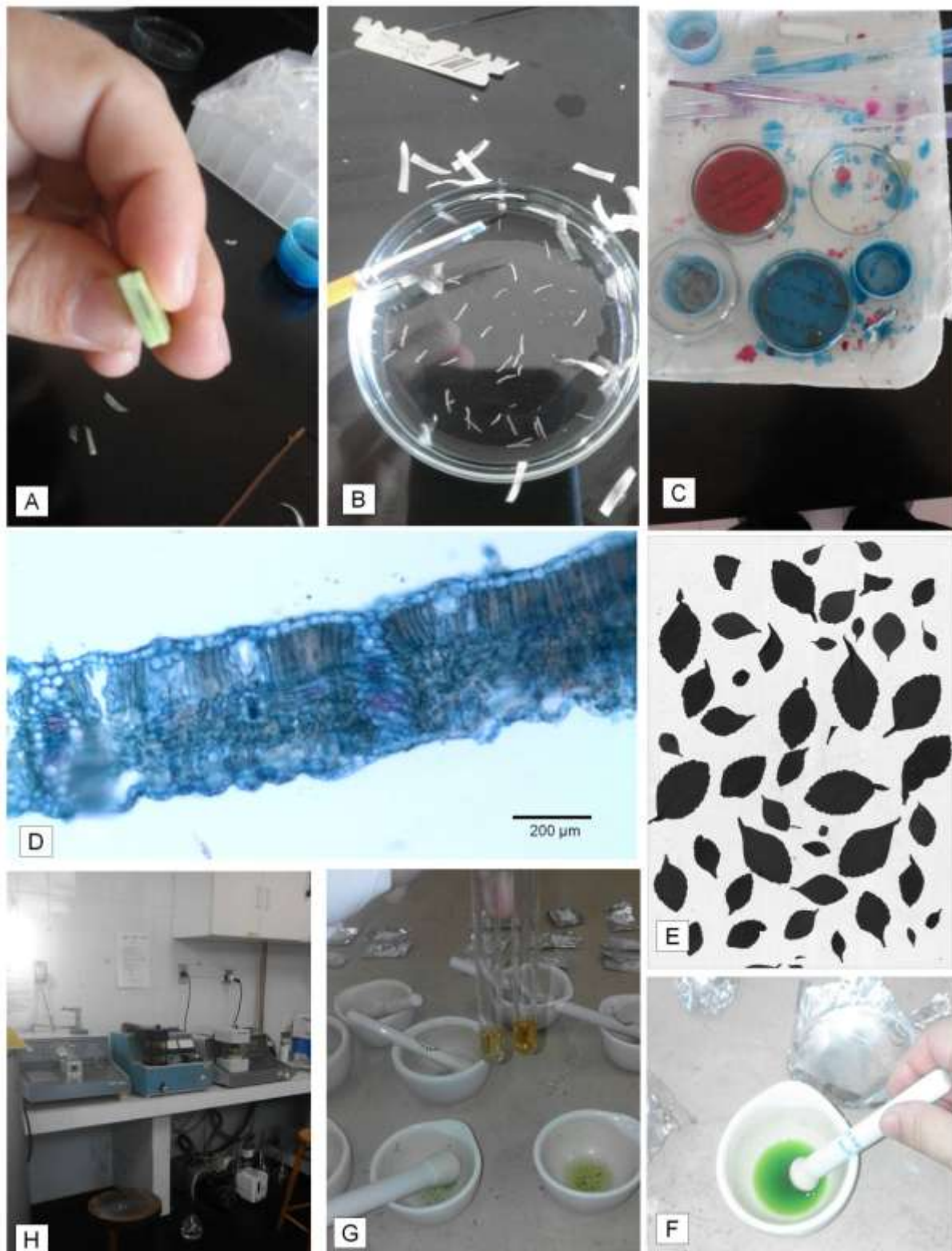
**Anexo 20.** Colheita do experimento com densidades de plantio e épocas de colheita. A e B: Aspecto das plantas colhidas antes do florescimento. Detalhe de B evidência a formação dos botões florais, sem, todavia, a abertura de nenhuma flor. C: Plantas no início do florescimento. D e E: Aspecto das plantas na fase de pleno florescimento. F e G: separação manual de folhas e ramos. Pinhais/PR (2015).



Fotos: Arquivo pessoal do autor.

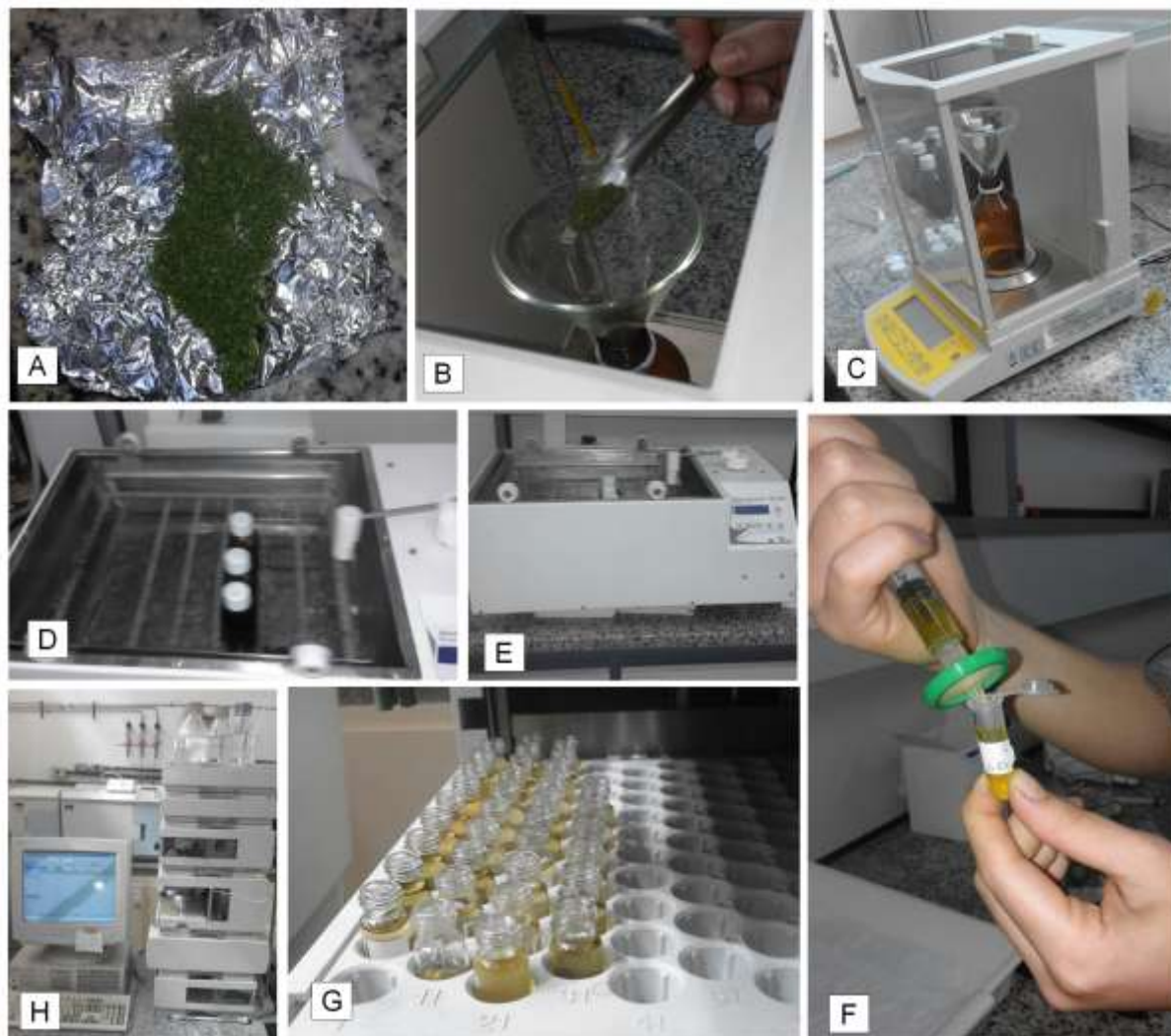


**Anexo 21.** Registro fotográfico das análises realizadas em diferentes experimentos. A, B e C: corte, separação e aplicação de corantes em segmentos de folhas de estêvia para medições no limbo foliar. D: exemplar das fotos utilizadas para medição do limbo foliar. E: imagem fornecida pelo programa WinRhizo a partir de scanner acoplado ao computador para medição da área foliar. F: Extração de clorofilas com Acetona 80% para quantificação dos pigmentos. G: Avaliação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico. H: Ponto crítico e metalizador do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Curitiba/PR, 2016



Fotos: Arquivo pessoal do autor.

**Anexo 22.** Registros fotográficos da extração e análise de glicosídeos de esteviol no Laboratório Tecfarma, Unisul. A: Folha de estévia seca e moída em liquidificador. B e C Acondicionamento e pesagem do pós das folhas em frasco de vidro. D e E: Banho maria com agitação onde foram dispostos os vidros contendo etanol e pó das folhas de estévia. F: Filtragem da solução de etanol e pó de folha. G e H: disposição e análise das amostra no aparelho de HPLC. Tubarão/SC, 2016.



Fotos: Arquivo pessoal do autor.